

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÔNICA AKEMI OKADA



**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DA
ARANHA MARROM (*Loxosceles intermedia*)**



CURITIBA

2010

MÔNICA AKEMI OKADA

**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DA
ARANHA MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Flavia Sant'Anna Rios

CURITIBA
2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto de Biologia Molecular do Paraná

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Mônica Akemi Okada**, no dia 08 de março de 2010, defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: "**Descrição morfológica do desenvolvimento embrionário da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**", com a Banca Examinadora constituída pelos professores: com a Banca Examinadora constituída pelos professores: Dra. Cloris Ditzel Faraco (Universidade Federal do Paraná), Dra. Cristina Lúcia Sant'Ana Costa- Ayub (Universidade Estadual de Ponta Grossa), e Dra. Flávia Sant'Anna Rios (como orientadora e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná, e tendo sido **Aprovada** recebendo o título de **Mestre na área de concentração em Biologia Celular e Molecular**, desde que apresente a versão definitiva da dissertação conforme regimento interno do Programa.

Curitiba, 08 de março de 2010



Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Biologia Celular e Molecular

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, benção e proteção.

Aos meus pais, pelas oportunidades que me proporcionaram, pelo carinho, companheirismo e principalmente pelo incentivo nos momentos difíceis.

À Prof.^a Flavia, pelas boas idéias, pela disposição, paciência, atenção, por todos os ensinamentos científicos e aconselhamentos. E principalmente pela confiança depositada no meu trabalho.

À Prof.^a Claudia, pela sua amizade, companheirismo e incentivo. Pela sua ajuda e dedicação. E pelo o estímulo de seguir profissionalmente.

À Prof.^a Cloris, pela ajuda e ensinamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

À Alana, pela amizade, convivência, e por estar sempre disposta a me ajudar.

Aos estagiários Anderson, Marcelo, Juliano, Niti e Fer pela colaboração neste trabalho.

Ao Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, pela doação de ootecas, as quais foram utilizadas no presente estudo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, representado pelos professores Silvio e Andrea, e à secretária Marlene.

A todos os professores do programa do Programa de Pós-Graduação pela formação e dedicação.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Aos meus companheiros de moradia, em especial à Flávia, à Fabi e ao Zé, pela ótima convivência no último ano de estudo e pelos momentos de diversão e apoio.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa, meu muito obrigado!

RESUMO

Devido ao aumento do número de casos de acidentes com aranhas-marrom, tem-se a necessidade de estudar os aspectos da embriologia da *Loxosceles intermedia*, a fim de contribuir com a elucidação de seu grande sucesso reprodutivo e ampla distribuição. A fêmea de *L. intermedia* põe seus ovos em uma ooteca pequena com aproximadamente 1 cm de diâmetro e de forma discóide. Seus ovos são esféricos, do tipo centrolécito e apresentam em média 1 mm de diâmetro. São revestidos por duas membranas, o córion e amembrana vitelínica. O objetivo do presente trabalho foi a descrição morfológica de todos os estádios do desenvolvimento embrionário da aranha marrom *L. intermedia*. Para tanto, os ovos foram fixados e processados para microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.. As mudanças externas ocorridas durante o desenvolvimento embrionário puderam ser observadas com o auxílio da parafina líquida. Os resultados obtidos permitiram dividir o desenvolvimento embrionário de *L. intermedia* em dez estádios: (1) Zigoto, (2) Clivagem, (3) Formação da blástula, (4) Contração da blástula, (5) Formação do disco germinativo, (6) Gastrulação (7) Segmentação, (8) Inversão, (9) Pré-larva, e (10) Eclosão. Os ovos de *L. intermedia* são do tipo centrolécitos e a clivagem é do tipo superficial. Os núcleos começam a se dividir no centro e migram para a periferia, formando a blastoderme sincicial. A seguir começam a se definir os limites celulares e tem-se formação da blastoderme celular. Os blastômeros migram para um dos pólos do ovo e formam o disco germinativo, no qual ocorre a formação dos folhetos germinativos. Após o início da segmentação, ocorre a inversão do embrião, que termina quando a forma típica do corpo das aranhas foi estabelecida. No próximo estágio as aranhas são chamadas de pré-larvas e demonstram um processo de organogênese inicial. Durante a eclosão, as aranhas ainda apresentam grande quantidade de vitelo, indicando que apresenta alimentação endógena ao menos no início do período larval.

Palavras chave: aranha marrom, *Loxosceles intermedia*, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

The increase of accidents caused by Brown spiders raised the interest on the embryology of *Loxosceles intermedia*, and the need of studies in order to contribute to elucidate their ample distribution and the great reproductive success of this species. *L. intermedia* females lay their eggs in a sac-like, with an average medium diameter of 1 cm, and discoid shaped cocoon. Their eggs are spherical, the type centrolecithal and have on average 1 mm in diameter. Are covered by two membranes, the chorion and vitelline envelope. The objective of this study was the morphological description of all stages of embryonic development of the brown spider *L. intermedia*. For both the eggs were fixed and processed for light microscopy and scanning electron microscopy. The external changes occurring during embryonic development could be observed with the help of liquid paraffin. The results obtained allowed to divide the embryonic development of *L. intermedia* in ten stages: (1) zygote, (2) cleavage, (3) formation of the blastocyst, (4) contraction of the blastocyst, (5) formation of the germinal disc, (6) gastrulation (7) segmentation, (8) inversion, (9) pre larval, and (10) outbreak. The eggs of *L. intermedia* is centrolecithal and the cleavage is the superficial type. The nuclei begin to divide and migrate in the center to the periphery, forming the syncytial blastoderm. Next begin to define the cell limits and has been training the blastoderm. Blastomeres migrate to one pole of the egg and form the germinal disc that occurs in the formation of germ layers. After the start of targeting the inversion of the embryo, which ends when the typical form of the body of the spiders was established. In the next stage spiders are denominated pre-larval and demonstrate a process of organogenesis stage. During the outbreak, the spiders also have a large amount of yolk, indicating it is endogenous feeding at least in the beginning of the larval period.

Keywords: brown spider, *Loxosceles intermedia*, embryonic development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A -	Representação esquemática do abdome do macho.....	15
Figura 1B -	<i>Synspermium</i>	15
Figura 2 -	Representação esquemática do abdome da fêmea.....	16
Figura 3 -	Corte de ovário de <i>Loxosceles intermedia</i>	17
Figura 4A -	Fêmea protegendo a sua ooteca.....	18
Figura 4B -	Ooteca aberta de <i>Loxosceles intermedia</i>	18
Figura 5 -	Esquema mostrando os estádios de pré-larva, larva e ninfa de aranhas.....	20
Figura 6 -	Esquema mostrando os principais eventos do desenvolvimento de aranhas.....	22
Figura 7 -	Processo de inversão da aranha <i>Agelena Labyrinthica</i>	23
Figura 8 -	Envoltórios dos embriões de <i>Loxosceles intermedia</i>	37
Figura 9 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 1.....	39
Figura 10 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 2.....	40
Figura 11 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 3.....	41
Figura 12 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 4.....	42
Figura 13 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 5.....	43
Figura 14 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 6.....	44
Figura 15 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 7.....	45
Figura 16 -	Cortes histológicos de embriões de <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 7.....	46
Figura 17 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 8 (I).....	47
Figura 18 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 8 (II).....	48
Figura 19 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 9.....	50
Figura 20 -	Cortes histológicos de embriões de <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 9.....	51
Figura 21 -	Embriões <i>Loxosceles intermedia</i> no estágio 10.....	52
Figura 22 -	Esquema mostrando corte longitudinal do prossoma de aranhas..	61
Figura 23 -	Esquema mostrando o cérebro rudimentar da <i>Tarantula sp</i>	61
Figura 24 -	Manutenção das aranhas em laboratório.....	68
Figura 25 -	Exemplares adultos de <i>L. intermedia</i>	69
Figura 26 -	Esquema da cópula <i>L. intermedia</i>	71
Figura 27 -	Ooteca de <i>L. intermedia</i> e estufa para manutenção das	

	espécimes.....	72
Figura 28 -	Coleta dos ovos.....	73
Figura 29 -	Embriões vivos em parafina líquida	74
Figura 30-	Passos para a montagem total	76
Figura 31 -	Processo para a retirada da membrana vitelínica.....	78
Figura 32 -	Sugestões para orientação dos cortes.....	81
Figura 33-	Embrião de <i>Loxosceles intermedia</i> com 3 dpo.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estádios do Desenvolvimento Embrionário de <i>Loxosceles</i> <i>intermedia</i>	38
Tabela 2 -	Fixadores que apresentam excelentes resultados para embriões de aranha (de <i>Loxosceles intermedia</i>)..	79

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONTEXTUALIZAÇÃO	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1.1 BIOLOGIA DAS ARANHAS.....	13
1.1.2 ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	13
1.1.3 REPRODUÇÃO DA ESPÉCIE <i>L. intermedia</i>	14
1.1.3.1 APARELHO REPRODUTOR.....	14
1.1.3.2 OVOGÊNESE	16
1.1.4 CÓPULA E OVIPOSIÇÃO EM <i>Loxosceles intermedia</i>	17
1.1.5 FERTILIZAÇÃO EM ARANHAS.....	18
1.1.6 OVOS E ENVOLTÓRIOS.....	19
1.1.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE ARANHAS.....	19
1.2 JUSTIFICATIVA.....	24
1.3 OBJETIVOS.....	25
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO II – ESTADIAMENTO DO EMBRIÃO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	29
2.1 INTRODUÇÃO.....	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.2.1 Coleta e manutenção dos animais.....	32
2.2.2 Cópula.....	32
2.2.3 Coleta dos ovos.....	32
2.2.4 Análise “ <i>in vivo</i> ” dos embriões.....	32
2.2.5 Microscopia de luz.....	33
2.2.6 Retirada dos envoltórios.....	33
2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	34
2.3 RESULTADOS.....	35
2.3.1 Oviposição e amostragem.....	35
2.3.2 Descrição dos envoltórios dos ovos.....	36
2.3.3 Desenvolvimento embrionário.....	36
2.3.2.1 Estádio 1: Zigoto (< 24h após a oviposição).....	36
2.3.2.2 Estádio 2: Clivagem (1 dpv).....	39
2.3.2.3 Estádio 3: Formação da Blastoderme (2 a 4 dpv).....	40
2.3.2.4 Estádio 4: Contração da Blástula (5 e 6 dpv).....	41

	11
2.3.2.5 Estádio 5: Formação do disco germinativo (7 dpo).....	42
2.3.2.6 Estádio 6: Gastrulação (8 a 12 dpo).....	43
2.3.2.7 Estádio 7: Segmentação (13 - 15 dpo).....	44
2.3.2.8 Estádio 8: Inversão (16 a 23 dpo).....	46
2.3.2.9 Estádio 9: Pré-larva (24 a 29 dpo).....	48
2.3.2.10 Estádio 10: Eclosão (30 dpo).....	52
2.4 DISCUSSÃO.....	53
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CAPÍTULO III – MÉTODOS PARA OBTENÇÃO, MANIPULAÇÃO E PREPARO DE EMBRIÕES DE ARANHAS	66
3.1. IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DOS EMBRIÕES DE ARANHA.....	67
3.2. OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES DE ARANHA	67
3.2.1. Manutenção dos Animais Adultos em Laboratório.....	67
3.2.2. Identificação da Fêmea e do Macho Adultos.....	68
3.2.3. Cópula.....	69
3.2.4. Oviposição.....	71
3.2.5. Coleta dos Ovos.....	72
3.3. ANÁLISE DOS EMBRIÕES INTACTOS E EM MONTAGENS TOTAIS.....	73
3.3.1. Utilização do Óleo de Parafina para Observação de Embriões Vivos.....	73
3.3.2. Montagem Total dos Embriões.....	74
3.4. RETIRADA DOS ENVOLTÓRIOS DOS OVOS.....	77
3.4.1 Técnica I.....	77
3.4.2 Técnica II.....	78
3.5. UTILIZAÇÃO DA MICROSCOPIA DE LUZ PARA OBSERVAÇÃO DE EMBRIÕES FIXADOS.....	78
3.5.1. Fixação.....	78
3.5.2. Inclusão.....	79
3.5.3. Microtomia.....	80
3.5.4. Coloração.....	81
3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
4. CONCLUSÕES.....	83
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA.....	84

Capítulo I – CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 BIOLOGIA DAS ARANHAS

As aranhas fazem parte de um grupo evolutivamente antigo (Classe Arachnida, Ordem Araneae), sendo que o fóssil mais antigo data de 300 milhões de anos atrás, no Período Carbonífero (PLATNICK, 1993). De acordo com este autor, o grupo apresenta cerca de 40.000 espécies descritas, classificadas de acordo com o tamanho, cor, marcas no corpo, assim como pela disposição dos olhos e estruturas reprodutivas. Do ponto de vista morfológico, possuem o corpo dividido em dois segmentos, o cefalotórax e o abdômen. Apresentam quatro pares de pernas, um par de quelíceras e um par de pedipalpos (RUPPERT e BARNES, 1996).

De acordo com Rash e Hodgson (2002), a Ordem Araneae apresenta três Subordens: Mesothelae, Mygalomorphae e Araneomorphae, sendo que as duas últimas constituem os grupos numericamente mais representativos. Os membros da subordem Mygalomorphae (ou Orthognatha) são aranhas primitivas (“trapdoor”) cujas quelíceras se projetam à frente, partindo do cefalotórax, enquanto as presas posicionam-se para baixo. Os representantes do grupo Araneomorphae (ou Labdognatha), com 2.700 gêneros e 32.000 espécies (FOELIX, 1996), possuem quelíceras posicionadas verticalmente e que, juntamente com as presas, se movem lateralmente como pinças (RASH e HODGSON, 2002).

No Brasil, espécies peçonhentas de aranhas pertencem ao grupo das Labdognathas (araneomorfos), tais como, *Latrodectus* (viúva negra – Theridiidae), *Phoneutria* (aranha armadeira – Ctenidae) e *Loxosceles* (aranha violino ou aranha marrom – Sicariidae), que são responsáveis por muitos casos de envenenamentos graves e registros de óbito (ESCOUBAS *et al.*, 2000). No entanto, na maioria das vezes as aranhas não trazem prejuízos ao homem, sendo extremamente importantes para o equilíbrio dos ecossistemas.

1.1.2 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Labdognatha (RUPPERT e BARNES, 1996; SOERENSEN, 1996). São popularmente denominadas aranhas marrons por possuírem um colorido uniforme, que varia de marrom claro ao escuro. De acordo com Bücherl (1972) são aranhas de

pequeno porte, com tamanho médio de 3 cm, poucos pêlos no corpo e pernas longas e finas, os machos são menores e possuem pernas relativamente mais longas do que das fêmeas. Possuem seis olhos, formando um semicírculo com três grupos de dois sobre o cefalotórax. O cefalotórax é baixo, não ultrapassando em altura o abdome (BÜCHERL, 1972).

A maior incidência de acidentes envolvendo a espécie humana deve-se ao fato da aranha ter adquirido hábitos intradomiciliares. As aranhas deste gênero não são agressivas, possuindo comportamento defensivo e picando seres humanos somente quando comprimidas inadvertidamente contra a pele, como por exemplo, no ato de vestir-se, enxugar-se ou durante o sono (SUAREZ *et al.*, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992). São animais sedentários e de hábito noturno, constroem teias irregulares, se escondem sob entulhos e troncos de árvores caídos, preferencialmente ocupando espaços escuros, ao abrigo das intempéries do ambiente. No interior das casas, habitualmente se encontram atrás de quadros, móveis, caixotes, nos cantos e em roupas colocadas próximas às paredes (SCHENONE e LETONJA, 1975). As fêmeas, em geral, são maiores que os machos e possuem veneno com maior concentração de proteínas, tal característica, associada com a grande produção de veneno, aumenta o potencial tóxico do envenenamento pela aranha fêmea (da SILVA *et al.*, 2004).

As aranhas que pertencem a este gênero reproduzem-se facilmente, podendo resistir a temperaturas entre 8 e 43° C (FUTRELL, 1992). Servem de alimento para anfíbios, répteis e aves, e alimentam-se de pequenos insetos, porém podem sobreviver por vários dias sem água e comida (LOWRIE, 1980; da SILVA *et al.*, 2004).

1.1.3 REPRODUÇÃO DA ESPÉCIE *Loxoseceles intermedia*

1.1.3.1 APARELHO REPRODUTOR

Segundo Costa-Ayub (2006), o aparelho reprodutor masculino de *L. intermedia* (Fig 1A) possui um par de testículos, que tem sua região proximal conectada a sua respectiva ampola por um ducto estreito. As ampolas, por sua vez, se ligam a canais chamados *vasa deferentia*, localizados entre os pulmões. As extremidades proximais dos *vasa deferentia* se fundem para dar forma a um canal ejaculatório que alcança a fenda genital.

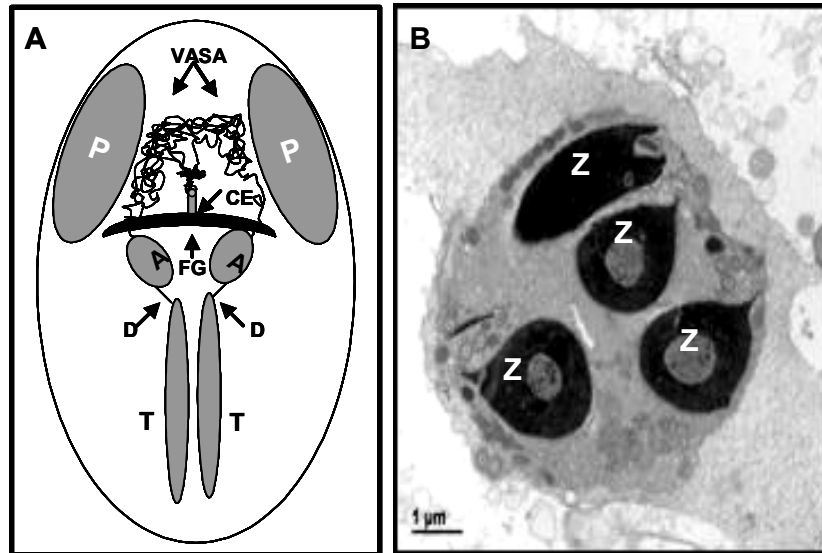


Figura 1 – (A) Representação esquemática da porção ventral do abdome do macho de *L. intermedia* mostrando a organização do aparelho reprodutivo. A – ampola, CE – canal ejacutório, D – ducto, FG – fenda genital, P – pulmão (mostrado apenas como ponto de referência), T – testículo, VASA – vasa deferentia. (B) – Synspermium dentro do testículo. Microscopia eletrônica de transmissão. Z – espermatozóide. Fonte: Costa-Ayub (2006) (reproduzida com permissão da autora).

Em *L. intermedia*, os espermatozóides produzidos nos testículos em forma de *synspermium*, que corresponde a um conjunto de quatro espermatozóides ligados entre si por pontes citoplasmáticas (Fig 1B.; COSTA-AYUB, 2006). E passam por um conjunto de canais e atingem o exterior através da fenda genital, na região ventral do abdome (COSTA-AYUB, 2006; OKADA *et al.*, 2006). A massa gelatinosa composta pelos espermatozóides e a secreção da *vasa deferentia* é captada e estocada dentro dos pedipalpos modificados, onde fica até o momento da cópula. A transferência dos espermatozóides do macho para a fêmea ainda se dá na forma de *synspermium*.

As fêmeas possuem duas espermatecas do tipo fundo de saco separadas espacialmente, e que são responsáveis por armazenar o fluido seminal. Por meio de um ducto, as espermatecas se conectam ao *uterus externus*. Este é separado da estrutura interna do aparato genital por uma projeção da parede dorsal e ventral do próprio *uterus externus* formando uma valva (Fig 2; COSTA-AYUB, 2006; MARGRAF *et al.*, 2006).

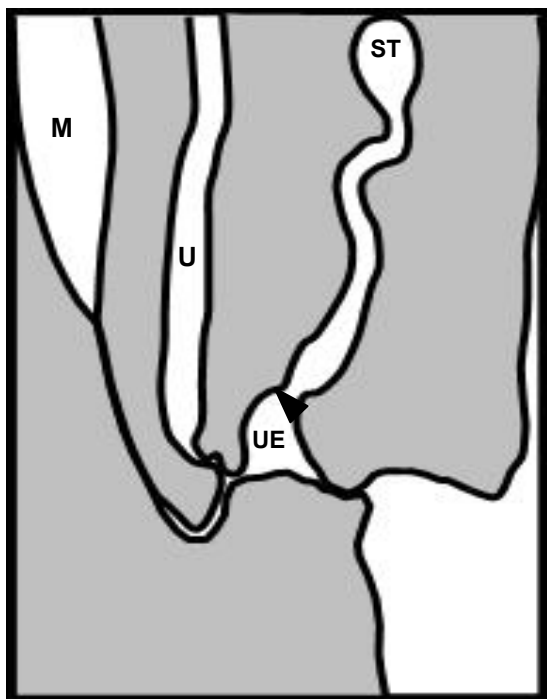


Figura 2 – Representação esquemática de um corte longitudinal da abertura genital do abdome de uma fêmea adulta de *Loxosceles intermedia*. Cabeça da seta – fenda genital, M – músculo, ST – espermateca, U – *uterus internus*, UE – *uterus externus*. Fonte: Margraf, *et al.* (2006) (reproduzida com permissão dos autores).

As estruturas internas do aparato genital compreendem o *uterus internus*, os ovidutos e os ovários. Estes são alongados, e neles os ovócitos se desenvolvem presos à parede ventral do epitélio ovariano, aderidas às células formadoras do pedúnculo (MORISHITA, 2003).

1.1.3.2 OVOGÊNESE

A ovogênese é um processo contínuo durante seu ciclo reprodutivo (OKADA *et al.*, 2007). No decorrer do qual, de acordo com Morishita (2003), inicialmente os ovócitos possuem tamanho similar às células do epitélio ovariano, diferindo apenas na morfologia do núcleo e apresentando volume citoplasmático ligeiramente aumentado. Durante a vitelogênese, o volume celular aumenta continuamente devido principalmente ao acúmulo de vitelo e as diferenças no tamanho e na morfologia permitiram à autora classificar os ovócitos em seis estádios distintos, o primeiro considerado imaturo e o último caracterizado pelo ovócito maduro, pronto para ser fertilizado (Fig.3 OKADA E COSTA-AYUB, 2007). Os ovócitos maduros são liberados na luz do ovário já envoltos pela membrana vitelina. Para que ocorra a ovulação, os grânulos de vitelo sofrem um drástico rearranjo, e o ovócito altera sua morfologia e arquitetura celular, assim como o epitélio ovariano, que se alarga aumentando a área disponível para a entrada do ovócito (MORISHITA, 2003). No trajeto para a abertura genital, recebem as camadas adicionais que vão constituir o córion (FERREIRA, 2001).

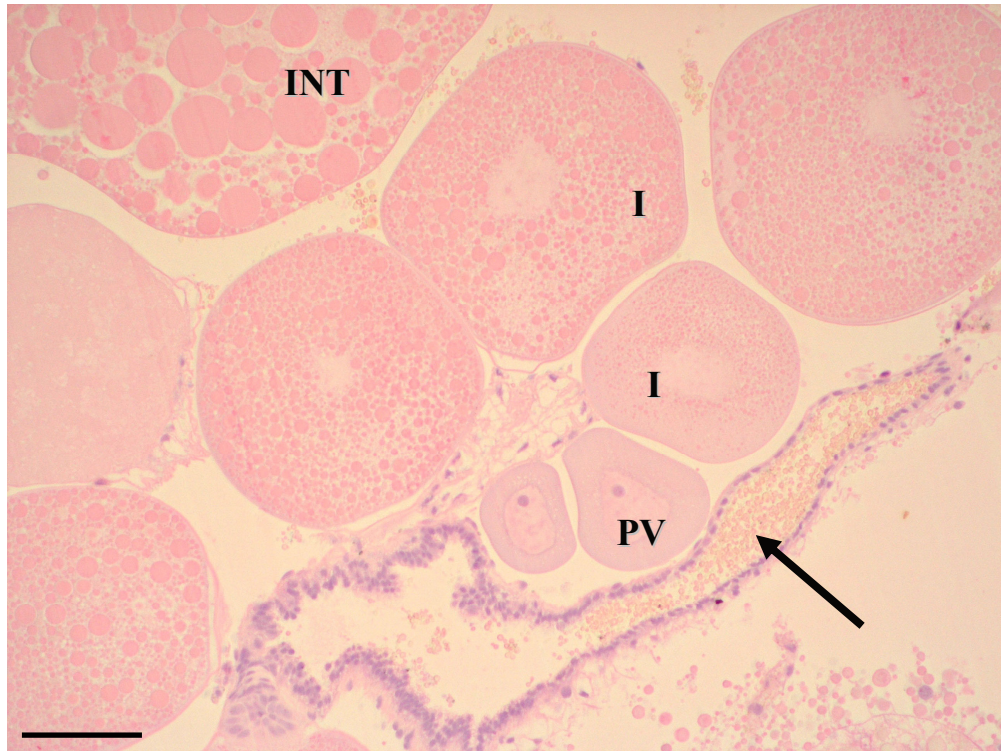


Figura 3. Corte longitudinal do ovário de fêmea jovem – HE. (seta) luz ovariana aberta, (PV) ovócitos pré vitelogênicos, (I) ovócitos em vitelogênes inicial, (INT) ovócitos em vitelogênes intermediária. Barra: 100 μ m. Fonte: Okada e Costa-Ayub, 2007.

1.1.4 CÓPULA E OVIPOSIÇÃO EM *Loxosceles intermedia*

Momentos antes do acasalamento, o macho faz diversos movimentos com seus gonopódios (FERREIRA, 2001). Durante a cópula, os animais ficam frente a frente, o macho em um plano mais baixo que a fêmea apoiado em suas pernas traseiras. Insere os bulbos na fenda genital da fêmea, sendo os espermatozóides depositados no interior das spermatecas, onde podem ficar estocados por prolongados períodos de tempo no interior desses receptáculos (UHL, 1994; GILBERT, 2006). No entanto, *L. intermedia* se reproduz preferencialmente nos meses mais quentes do ano (FISCHER E VASCONCELOS, 2005).

A fêmea constrói uma teia complexa, a ooteca, cuja função é proteger os ovos de possíveis predadores e intempéries do ambiente (Fig. 1A e 1B). Em geral apresenta aproximadamente 1 cm de diâmetro, possuindo a forma discóide e esbranquiçada. De acordo com Fischer (2005), momentos antes da postura, a fêmea começa a construção da ooteca, movimentando-se em círculos e direcionando o abdome da periferia para o centro. Depois de pronta a parte inferior da ooteca, inicia-se a postura. Terminada a postura, a fêmea dá início à construção da parte superior da ooteca. Após o término da construção da ooteca a fêmea se posiciona sobre a mesma, indicando isto um intenso cuidado com sua prole (FISCHER E VASCONCELOS, 2005).

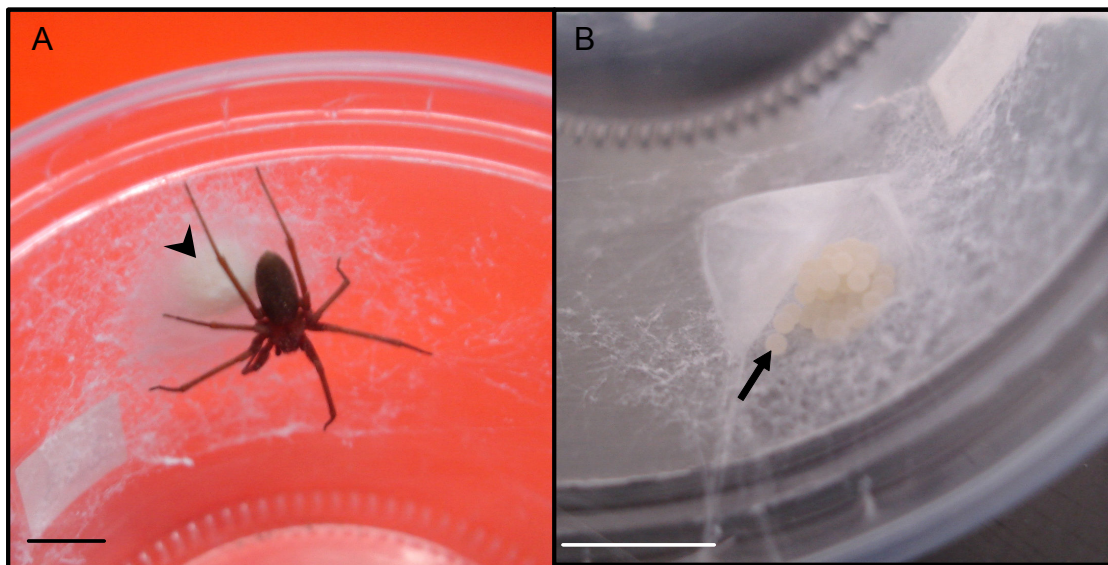


Figura 4. (A) Fêmea de *Loxosceles intermedia* protegendo sua ooteca (cabeça de seta). (B) Ooteca aberta, mostrando os ovos (seta). Barra: 1cm. As imagens foram obtidas a partir da coleção existente no laboratório.

1.1.5 FERTILIZAÇÃO EM ARANHAS

A fertilização nas aranhas é um assunto pouco explorado e controverso. Valente (1984) discute a fertilização em *Romphobetens sorocabae*, hipoteticamente descrita como sendo externa. O autor descreve que a fêmea é observada liberando os ovócitos e um líquido, que seria o esperma, de modo intercalado à deposição dos ovócitos. Posteriormente, fecha a ooteca e a gira, como se estivesse misturando os ovócitos com a secreção. Suzuki e Kondo (1994) relatam terem observado em *Achaearanea japonica* o núcleo espermático aproximadamente a uma distância de 50 μ m da superfície do ovócito, e que, 3,5 horas após a oviposição, a primeira divisão nuclear foi observada no centro da célula. Por outro lado, Suzuki (1995)

descreve a ocorrência de fertilização interna para *A. tepidariorum* com base em observações de microscopia de luz e eletrônica de ovos que haviam acabado de serem liberados pela fêmea, já na fase de telófase da primeira clivagem.

Segundo Foelix (1996), a fertilização ocorreria no *uterus externus* e, uma hora após o núcleo espermático migraria em direção ao centro do ovócito. Neste momento, o pronúcleo feminino, que teria completado a segunda divisão meiótica, também se desloca para o centro (SUZUKI e KONDO, 1994). A conjugação dos dois núcleos (cariogamia) ocorre 1-2 horas mais tarde (MONTGOMERY, 1909). Contudo para a aranha marrom *L. intermedia* não existem relatos dos aspectos que envolvem a interação ovócito e espermatozóide no momento da fertilização.

1.1.6 OVOS E ENVOLTÓRIOS

Os ovos de aranhas são do tipo centrolécito (FOELIX, 1996), ou seja, possuem grande quantidade de vitelo localizado no centro, circundado por citoplasma que ocupa a periferia e que se projeta em raios para o centro do ovo (GARCIA e GARCÍA, 2001).

Duas camadas de revestimento envolvem os ovos das aranhas: o córion e a membrana vitelínica. O córion é uma camada que funciona como uma barreira de proteção entre o ovo e o meio (FOELIX, 1996). O envoltório vitelínico, que se situa abaixo do córion, se apresenta como uma membrana lisa que envolve todo o ovo e que, segundo Rempel (1957), tem a função de controlar a entrada do espermatozóide. Na maioria dos organismos, a membrana vitelínica apresenta, em sua composição, moléculas que são reconhecidas por espermatozóides da mesma espécie e que desencadeiam a liberação das enzimas do acrossoma, dando início ao processo de fecundação (GILBERT, 2006).

1.1.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE ARANHAS

A ontogenia das aranhas pode ser dividida em três períodos: embrionário, larval e ninfo-imaginário (VANCHON, 1957). O período embrionário se estende da fertilização até a eclosão, quando as formas típicas do corpo da aranha são estabelecidas. Durante o período larval, a aranha não possui todas as características morfológicas típicas da espécie e apresenta alimentação endógena (vitelo). Já no período ninfo-imaginário (ninfa), as aranhas possuem todos os órgãos

e sistemas, são auto-suficientes (alimentação exógena), diferindo dos adultos em seu tamanho e por serem sexualmente imaturas (FOELIX, 1996) (Fig.5).

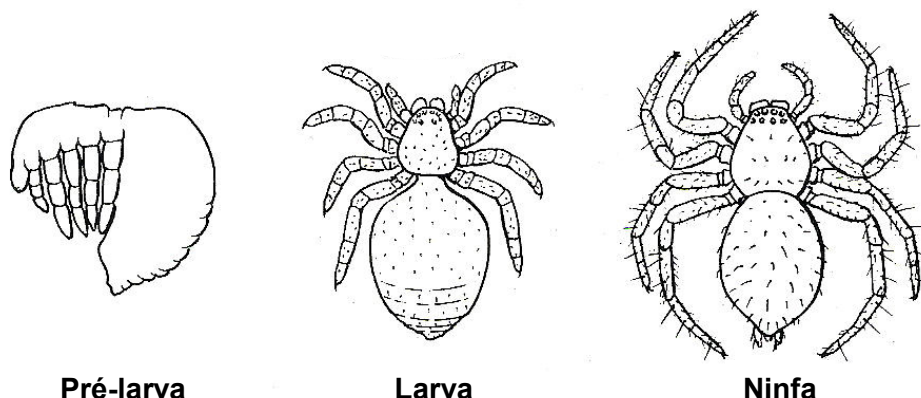


Figura 5. Esquema mostrando os estádios de pré-larva, larva e ninfa de aranhas (Adaptado a partir de Foelix, 1996)

Durante o período de clivagem, o embrião sofre uma série de divisões mitóticas. Nos ovos dos artrópodos, como as aranhas, ocorre cariocinese diversas vezes antes de haver citocinese, ocorrendo a formação de um sincício (GILBERT, 2006). Após os núcleos migrarem para periferia do ovo, as células se individualizam, formando a blastoderme com células grandes e pavimentosas que envolvem toda a massa de vitelo (HOLM, 1952).

Em *Achaeearanea japonica*, grande número de grânulos de vitelo circundam o citoplasma perinuclear e são organizados em arranjos radiais durante os estádios iniciais da clivagem. Este arranjo pode ser causado pela distribuição radial do citoplasma, que contém feixes de microtúbulos. Os microtúbulos participam da divisão e da migração dos núcleos para formar a blastoderme, que ocorre exatamente 16 horas após a oviposição na espécie citada (SUZUKI, 1995).

Após a formação da blastoderme, os grânulos de vitelo se contraem para a parte inferior da mesma, originando o espaço perivitelínico, que é preenchido pelo líquido perivitelínico. Quando há o aparecimento deste espaço ocorre o próximo estágio, que é chamado de contração da blástula (FOELIX, 1996).

Suzuki (1995) relata que a concentração das células da blastoderme no estágio de contração da blástula pode estar relacionado com a formação do disco germinativo, em que as células migram para um dos pólos do ovo e deslocam o vitelo para a área restante.

De acordo com Montgomery (1909) depois de formada a blastoderme algumas células tornam-se ligeiramente elevadas na superfície do embrião,

formando a placa primitiva (ou *cumulus* anterior) (Fig. 6B), rico em células denominadas vitelócitos. Estas células endocitam rapidamente o vitelo que circunda uma pequena cavidade, a gastrocele. O *cumulus* posterior surge como uma camada mais elevada e proeminente, que marca o limite entre os segmentos torácico e abdominal. Este estágio é chamado de gastrulação e segundo Chaw *et al.* (2007) para a aranha *Zygiella x-notata* tal estágio se divide em 3 fases distintas. A fase I compreende a formação do blastóporo, que envolve o ingresso de pelo menos 20 células da blastoderme. A fase II começa quando as células que formam o *cumulus* começam a migrar para a periferia do disco germinativo. E a fase III envolve um mecanismo diferente, o qual formará o lobo caudal.

Durante a gastrulação, as células mesequimais do *cumulus* posterior são internalizadas e migram em direção à borda do disco germinativo (HOLM, 1940; AKIYAMA-ODA e ODA, 2003) (Fig. 6C, D). Segundo Foelix (1996), a partir do disco germinativo surgem o lobo cefálico, lobo caudal e os somitos metaméricos, os quais representam os respectivos segmentos dos pedipalpos e as pernas (Fig. 6I).

A partir do disco germinativo se origina a banda germinativa que se alonga em torno do ovo até que seus prolongamentos anterior e posterior quase se tocam (CHAW e *al.*, 2007; MCGREGOR *et al.*, 2008), formando o lobo cefálico e lobo caudal. O lobo cefálico emite um segmento adicional, o segmento caudal o qual se divide para formar o primeiro segmento abdominal. No interior do corpo as cavidades celômicas tornam-se estabilizadas quando a mesoderme separa as paredes dessas cavidades posteriores que se diferenciam em tecido muscular (FOELIX, 1996).

Apartir desse momento, o embrião passa por um processo chamado de inversão (Fig. 6L e 7). Nesse processo, ocorre a formação de um sulco longitudinal na região média da banda germinativa. A expansão deste “sulco ventral” começa a separar os segmentos pré-quelicerais até o quinto segmento opistossomal separando os lados desses segmentos (LIU *et al.*, 2009). Conforme este sulco vai aumentando ele desloca lateralmente as duas metades do corpo do embrião do embrião, expondo a massa de vitelo abaixo do sulco mediano. Em seguida, as extremidades abdominais vão se diferenciando e a metade dorsal do embrião está na direção oposta à banda germinal. Ou seja, o lobo cefálico numa extremidade e o lobo caudal em outra. A constrição entre o primeiro segmento abdominal demarca o limite entre o prossomo e o opistossoma. Quando a forma típica do corpo da aranha

é estabelecida chega ao fim o processo de inversão. O próximo estágio é chamado de pré-larva (FOELIX, 1996) (Fig. 7).

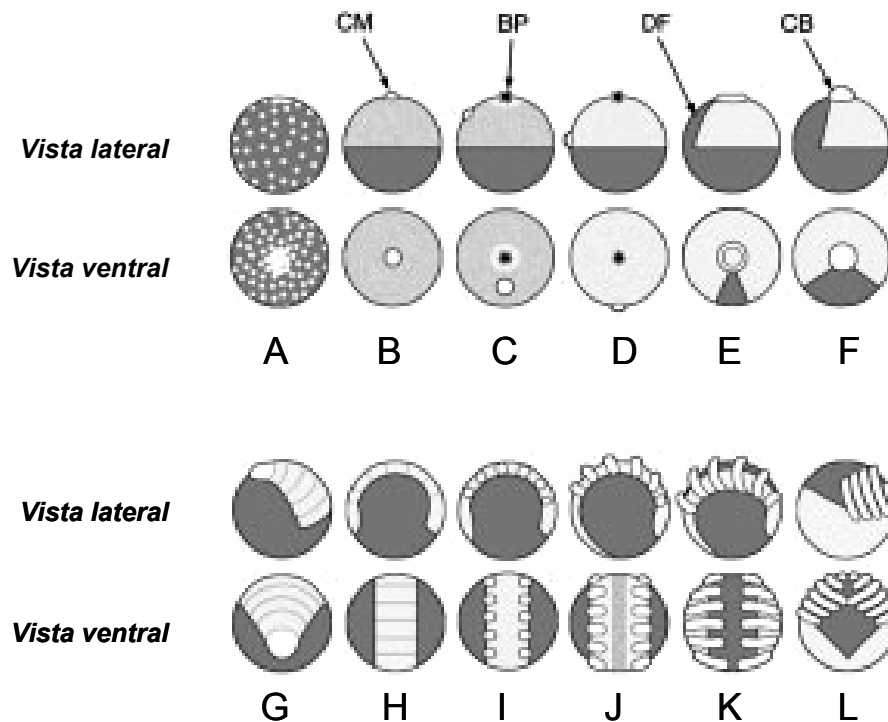


Fig 6. Esquema mostrando os principais eventos ocorridos durante o desenvolvimento embrionário da aranha *Zygiella x-notata*, com especial destaque para o período de gastrulação. BP = blastôporo; CB = Botão caudal; CM = *cumulus* e DF = campo dorsal. (Adaptado a partir de Chaw *et al.*, 2007).

Recentemente o desenvolvimento embrionário também tem sido estudado sob o ponto de vista molecular. Como exemplo, Stollewerlk e Seyfarth (2008) descreveram o desenvolvimento de órgãos mecanosensoriais na aranha *Cupiennius salei*, através de interferência do RNA. Akiyama-Oda e Oda (2006) isolaram um homólogo do gene *Sog* de *Drosophila* (*Antagonist Short Gastrulation*) no embrião da aranha *Achaeearanea tepidariorum* e caracterizaram suas expressão e função. Verificaram que uma deleção no gene *Sog* da aranha conduz a uma perda quase completa das estruturas ventrais, indicando a função deste gene na padronização da região ventral do disco germinativo.

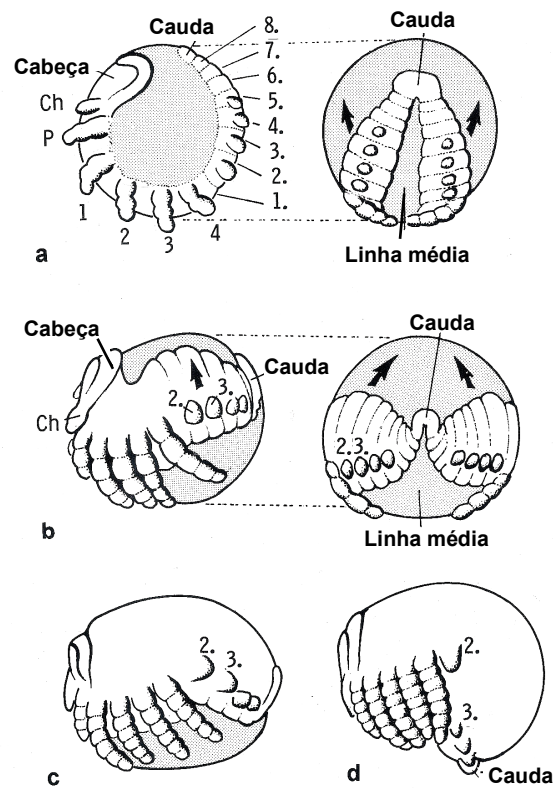


Figura 7. Processo de inversão do embrião de aranha *Agelena labyrinthica* **(A)** Começo da inversão. **(B)** Primórdios das extremidades externas aparecem nos segmentos abdominais. **(C)** Paredes laterais do corpo se fundem na linha média dorsal. **(D)** Término da inversão. Ch: quelícera; P: pedipalpo. (Adaptado a partir de Foelix, 1996)

1. 2 JUSTIFICATIVA

Com a implantação dos Centros de Controle de Intoxicações/ Centro de Informações Toxicológicas (CCI/CIT), pelo Ministério da Saúde (MS), a partir da década de 70, evidenciou-se que acidentes causados por animais peçonhentos correspondiam à segunda causa de atendimento nestas unidades, superado somente por intoxicações medicamentosas.

No Brasil, os acidentes ocasionados por picada de aranhas do gênero *Loxosceles* foram documentados a partir de 1954, com maior incidência no Estado do Paraná (dados do Centro de Epidemiologia do Paraná), onde ocupam o primeiro lugar em ocorrências, comparados com outras intoxicações.

Segundo Van Lenteren (1999), a pesquisa básica deve ter prioridade, pois irá quase sempre resultar em aplicações práticas, como programas de manejo de pragas, com redução de aplicações de produtos químicos convencionais através da manutenção da diapausa. Desta maneira, a pesquisa fundamental em reprodução e desenvolvimento poderá contribuir com soluções sustentáveis para os problemas atuais.

Apesar de o gênero *Loxosceles* ser de muita importância do ponto de vista epidemiológico e de saúde pública, os estudos voltados para a biologia reprodutiva e do desenvolvimento desse animal são escassos e pouco aprofundados. Baseado nisso, este estudo visa uma descrição de todo o desenvolvimento embriológico da *L. intermedia*, gerando dados que possibilitem medidas de controle populacional da aranha marrom desde o período embrionário.

Além do que o uso do modelo por nós escolhido possui uma fácil manutenção em condições laboratoriais e um período embrionário curto, desta maneira sendo um bom modelo para estudos em campo da biologia celular.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Realizar a descrição morfológica de todos os estádios do desenvolvimento embrionário da aranha marrom *Loxosceles intermedia*.

1.3.2 Objetivos específicos

- A. Descrever, morfolologicamente, o desenvolvimento embrionário da aranha marrom *Loxosceles intermedia*, bem como os envoltórios dos ovos, por meio do emprego de técnicas de microscopia de luz e eletrônica.
- B. Verificar a seqüência temporal e descrever as principais alterações celulares e os movimentos morfogênicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário de *L. intermedia*.
- C. Caracterizar os estádios do desenvolvimento embrionário de *L. intermedia* com base nas características morfológicas.
- D. Estabelecer protocolos de obtenção, manutenção e de preparo de embriões e aranhas para microscopia de luz e eletrônica.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA-ODA, Y.; ODA, H. Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. **Development** . v.130, p.1735–1747, 2003.

AKIYAMA-ODA, Y.; ODA, H. Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. **Development**, v.133, p.2347-2357, 2006.

BÜCHERL, W. As aranhas. In: **Invertebrados**. 1ª ed. São Paulo: Edart, 1972.

CHAW, R. C.; VANCE, E.; BLACK, S. D. Gastrulation in the spider *Zygiella x-notata* involves three distinct phases of cell internalization. **Dev. Dynamics**, v. 236, p.3484-3495, 2007.

COSTA-AYUB, C.L.S. **Estudo da espermatogênese e da morfologia dos espermatozoides da aranha marrom *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão (1934) (araneae: Sicariidae) antes e após a cópula**. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v.44, p.693-709, 2004.

ESCOUBAS, P; DIOCHOB, S; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**. v.82, p.893-907, 2000.

FERREIRA, S.A. **Análise dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário da aranha marrom “*Loxosceles intermedia*”**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Parameters affecting fecundity of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão 1934 (ARANEAE, SICARIIDAE). **Journal of Arachnology**. v.33, p.670–680, 2005.

FOELIX, R.F. **Biology of Spiders**. 2ª Ed. New York Harvard: V. Press, Cambridge, 1996.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.** v.304, p.261-267, 1992.

GARCIA, S.M.; GARCÍA FERNANDEZ, C. **Embriologia**. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

GILBERT, F.S. **Developmental Biology**. Massachusetts: Ed. Sinauer Associates, 2006.

HOLM, A. Studien über die Entwicklung und Entwicklungsbiologie der Spinnen. **Zool. BiDr Uppsala**. v.19, p.1-214, 1940.

HOLM, A. Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung und entwicklungsphysiologie des Spinnenembryos. **Zoll. Bidrag. Uppsala.** v. 29, p. 293-424, 1952.

LIU, Y.; MAAS, A.; WALOSZEK, D. Early development of the anterior body region of the grey widow spider *Latrodectus geometricus* Koch, 1841 (Theridiidae, Araneae). **Arthropod Struct Dev.** Apr 15, 2009.

LOWRIE, D.C. Starvation longevity of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae). **Ent. News.** v.9, p.130-132, 1980.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon.** v.26, p.759-772, 1988.

MARGRAF, A.; OKADA, M.A.; COSTA AYUB, C.L.S.; FARACO, C.D. Estudo Morfoanatômico do aparato genital de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão 1934 (Aranea: Sicariidae). **Anais do XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG.** Ponta Grossa, 2006.

MCGREGOR, A.P.; PECHMANN, M.; SCHWAGER, E.E.; FEITOSA, N.M.; KRUCK, S.; ARANDA, M.; DAMEN, W.G.M. Wnt8 Is Required for Growth-Zone Establishment and Development of Opisthosomal Segments in a Spider. **Current Biology** v.18, p. 1619–1623, 2008.

MONTGOMERY JUNIOR, T.H. The developmental of theridium, an aranead, up to the stage of reversion. **J. Morphol.** v. 20, n. 02, p. 298-351, 1909.

MORISHITA, R. **Estudo das interações entre ovócitos e células foliculares no ovário da aranha-marrom, *Loxosceles intermedia*.** Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

OKADA, M.A.; MARGRAF, A.; COSTA AYUB, C.L.S.; FARACO, C.D. The female genitalia morphology and the arrangement of sperm cells of *L. intermedia* (Araneae, Sicariidae). **Anais do SBBC-SIMEC.** p.28, Búzios, 2006.

OKADA, M.A.; COSTA AYUB, C.L.S. : Análise comparativa da morfologia do ovário da aranha marrom *Loxosceles intermedia* (Araneae; Sicariidae) antes e após a cópula. **Anais do XVI Encontro Anual de Iniciação Científica.** Maringá, 2007.

PLATINICK, N. I. Advances in spider taxonomy 1988-1991. **The New York Entomological Society.** New York, 1993.

RASH, L.D. E HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of venoms. **Toxicon.** v.40, p.225-254, 2002.

REMPEL, J. C. The embriology of black widow spider. *Latrodectus mectans*. **Can. J. Zool.**, v. 35, p. 35-57, 1957.

RUPPERT, E.E. E BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados.** 6ª ed. São Paulo: Ed. Roca, 1996.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biologia y distribuicion geográfica de las aranas del género *Loxosceles*. **Bol. Chil. Parasitol.** v.30, p.27-29, 1975.

SUZUKI, H. Fertilization occurs internally in the spider *Achaearanea tepidariorum* (C. Koch). **Inv. Reprod. Dev.** v.28, n. 03, p.211-214, 1995.

SUZUKI, H; KONDO, A. Early embryonic development, including germ-disk stage, in the Theridiid spider *Achaearanea tepidariorum*. **J. Morphol.** v. 224, p. 147-157, 1994.

SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento.** Editora Atheneu, 1996.

STOLLEWERLK, A.; SEYFARTH, E. A. Evolutionary changes in sensory precursor formation in arthropods: Embryonic development of leg sensilla in the spider *Cupiennius salei*. **Developmental Biology.** v.313, n. 2, p. 659-673, 2008.

SUAREZ, G.; BIGGERMANN, U.; SCHENONE, H. Estudios bioquímicos del veneno de *Loxosceles laeta* y sus mecanismos de acción. **Bol. Chil. Parasitol.** v.26, p.60-62, 1971.

UHL, G. Ultrastructure of the accessory glands in the female genitalia of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Pholocidae; Araneae). **Acta Zoologica** (Stokholm) v. 75, p. 13-25, 1994.

VALENTE, M.M. **Estudo anátomo-histológico do aparelho genital da fêmea de *Romphobetens sorocabae* Mello-Leitão, 1923 (Araneae – Aviculariidae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1984.

VANCHON, M. Contribution à l'étude du développement postembryonnaire des araignées. Première note. Généralités et nomenclature des stades. **Bull. Soc. Zool.** v.82, p.337, 1957.

VAN LENTEREN, J. C. Fundamental knowledge about insect reproduction: essential to develop sustainable pest management. **Inv. Reprod. Develop.**, Philadelphia, v. 36, p. 1-15, 1999.

CAPÍTULO II – Estádios do desenvolvimento embrionário da aranha marrom *Loxosceles intermedia* (ARANEAE; SICARIIDAE).

2.1 INTRODUÇÃO

A despeito da distribuição cosmopolita e da importância para a saúde pública do gênero *Loxosceles*, estudos voltados para a biologia do desenvolvimento destas aranhas ainda são muito escassos.

Segundo Vanchon (1957), a ontogenia das aranhas pode ser dividida em três períodos: embrionário, larval e ninfo-imaginário, nos quais o período embrionário se estende do momento da fertilização até a eclosão.

Os ovos dos artrópodos, tais como as aranhas, são do tipo centrolécito, possuindo uma grande quantidade de vitelo localizado na região central, circundado por citoplasma que se projeta de periferia para o centro do ovo (BRESSAN & MULLER, 1997; GARCIA e GARCÍA, 2001). O vitelo representa uma adaptação evolutiva que capacita um embrião a se desenvolver na ausência de uma fonte alimentar exógena, podendo ainda influenciar o padrão de clivagem de uma espécie (GILBERT, 2006).

A clivagem deste tipo de ovo é do tipo superficial, na qual, inicialmente apenas os núcleos sofrem divisões (cariocinese). Na sequência os núcleos migram para a região marginal do ovo, continuando a se dividir quando chegam à periferia, embora em ritmo mais lento, sendo cada núcleo circundado por uma porção de citoplasma, resultando numa blastoderme sincicial (GILBERT, 2006).

À medida que o desenvolvimento progride, ocorre a celularização destes núcleos e a formação da blastoderme celular. O tempo requerido para a formação da blastoderme pode variar de acordo com a espécie estudada. Em abelhas, o processo pelo qual é formada a blastoderme consome cerca de 40% do tempo (cerca de 30 horas) entre a oviposição e a eclosão (FLEIG & SANDER, 1985). Já no desenvolvimento de *Bombyx mori* (Lepidoptera, Insecta), a blastoderme se forma 9-10 horas após a oviposição (TAKESUE *et al.*, 1980).

Após a formação da blástula, os grânulos de vitelo são deslocados para uma das extremidades da blástula e aparece um espaço que é preenchido por um fluido denominado líquido perivitelínico (FOELIX, 1996). Este estágio é chamado de contração da blástula (FOELIX, 1996).

No próximo estágio, as células começam a migrar para um dos pólos do embrião, formando o disco germinativo. Na sequência algumas células se tornam ligeiramente elevadas na superfície do ovo formando o *cumulus*, o qual migra em

direção a periferia do disco germinativo (HOLM, 1940). Alguns estudos estabelecem o *cumulus* como um importante sítio de comunicação célula-célula que estabelece a polaridade axial do embrião (AKIYAMA-ODA e ODA, 2006). Akiyama-Oda e Oda (2003) encontraram no *cumulus* de *Achaeearanea tepidariorum* um sítio de sinalização do gene *decapentaplegic (dpp)*. Na mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) o gene *dpp* está relacionado à padronização da região dorsal deste animal (GILBERT, 2006). Este estágio é chamado de gastrulação, que de acordo com Chaw *et. al* (2007), a gastrulação é um processo morfogenético que estabelece as camadas germinativas e converte a polaridade simples do ovo em uma organização mais complexa no embrião tardio.

A partir do disco germinativo, se origina a banda germinativa que se alonga em torno do ovo até seus prolongamentos anterior e posterior quase se tocarem, formando o lobo cefálico e lobo caudal (CHAW *et al.*, 2007; MCGREGOR *et al.*, 2008).

De acordo com Foelix (1996), o lobo cefálico, lobo caudal e somitos metaméricos se estendem a partir de uma região chamada banda germinativa. Do ponto de vista molecular, para a aranha *Cupiennius salei*, se faz necessária a sinalização do genes *Delta-Notch* para a formação dos segmentos posteriores do embrião (STOLLEWERLK, *et. al.*, 2003). O *knockdown* destes genes através de RNAi resulta em uma malformação dos segmentos opistossomais (SCHOPPMIEIER e DAMEN, 2005; MCGREGOR *et. al.*, 2009).

O aparecimento de um sulco longitudinal na banda germinativa marca o início da inversão. Conforme o sulco aumenta, ele desloca cada uma das partes do ovo até sua completa fusão na linha dorsal. Quando a forma típica do corpo das aranhas é estabelecida chega ao fim o processo de inversão (FOELIX, 1996). E o próximo estágio é chamado de pré-larva.

Durante o período larval, a aranha ainda possui características morfológicas do “estágio incompleto”, apresentado alimentação endógena (HOLM, 1940). O que não ocorre no período ninfo-imaginário, no qual, seus órgãos e sistemas já estão formados, sendo auto-suficientes (FOELIX, 1996).

Este capítulo foi destinado à investigação do desenvolvimento embrionário da aranha marrom *L. intermedia*, bem como dos envoltórios dos ovos, por meio de diferentes técnicas de microscopia. A partir desta descrição morfológica, foi proposto um sistema de estadiamento para esta espécie.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS¹

2.2.1 Coleta e manutenção dos animais

Espécimes adultos de *L. intermedia* foram coletados em ambientes urbanos de Curitiba e Ponta Grossa (PR), e acondicionados individualmente em frascos plásticos transparentes de 150 mL ao abrigo de luz intensa. Em 2008, as aranhas foram mantidas em temperatura ambiente, tendo sido transferidas para ambiente climatizado (29°C) a partir de 2009. A umidade foi mantida com algodão umedecido e a alimentação se constituiu de larvas de besouro (*Tenebrio molitor*), oferecidas às aranhas quinzenalmente.

2.2.2 Cópula

Os animais foram colocados em recipientes plásticos transparentes na proporção de um macho para uma fêmea, mantidos em local escuro e silencioso e monitorados constantemente até o momento da cópula. Após a cópula os animais foram separados e re-acondicionados nos seus frascos de origem.

2.2.3 Coleta dos ovos

As fêmeas foram monitoradas diariamente para verificação da ocorrência de oviposição. Após a postura, a fêmea foi retirada do recipiente, com vistas a evitar a ingestão dos ovos pela mesma, o que frequentemente ocorre após a manipulação. As ootecas foram abertas com a ajuda de pinças de ponta fina e agulhas, preservando ao máximo a sua forma para evitar a dessecação dos ovos. Para remover os ovos da ooteca foram utilizados pincéis, e, com movimentos suaves, os embriões foram rolados para fora da ooteca. Amostras de embriões foram coletadas periodicamente da ooteca, conforme descrito no item 2.2.4, de modo a se obter os vários estádios de desenvolvimento.

2.2.4 Análise “*in vivo*” dos embriões

Pelo menos seis embriões coletados de cada ooteca foram colocados em placas de Petri de 3 cm de diâmetro contendo parafina líquida (óleo mineral). A parafina líquida permite que os embriões permaneçam vivos e tornam o córion transparente, permitindo a observação diária das mudanças ocorridas nos embriões.

¹ Maiores detalhes da obtenção dos embriões, bem como dos procedimentos analíticos utilizados, são descritos no Capítulo III desta dissertação.

Estes embriões foram fotografados periodicamente com o auxílio de uma câmera digital acoplada a um esteromicroscópio.

2.2.5 Microscopia de luz

Pelo menos seis embriões de cada estágio foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por três horas, a 4°C. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato 0,1M, desidratados em série crescente de etanol, com intervalos de 10 minutos cada, e emblocados em historesina JB4 ou Leica. Cortes seriados de 3 a 5 µm foram obtidos e, posteriormente, corados com Hematoxilina Eosina (HE), Azul de Toluidina, PAS e Ninhidina-Schiff. As lâminas foram analisadas e fotografadas através de uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz.

2.2.6 Retirada dos envoltórios dos ovos

De acordo com a necessidade, é possível se retirar os envoltórios dos ovos. Para a retirada do córion dos embriões em fase de pré-larva, os mesmos foram lavados em hipoclorito de sódio 50%, três banhos de 5 minutos cada, sob agitação constante e, então, lavados com água destilada.

Para a retirada da membrana vitelínica, após o procedimento descrito acima, os embriões foram colocados em uma solução de heptano acrescido do fixador paraformaldeído 4% (1:1 vol:vol), e mantidos sob agitação constante durante 20 minutos. Ao se notar que a membrana já estava separada do embrião foi acrescido um volume de metanol puro, ficando a solução em uma proporção de 1:1:1, sob agitação constante. Com a perda da membrana vitelínica (após aproximadamente 50 minutos), os embriões se depositaram no fundo do frasco. Foram, então, lavados três vezes em metanol e nele mantidos a 4°C até o processamento.

A metodologia acima não foi eficiente para a retirada do córion dos embriões em estádios menos avançados. Por outro lado, estes foram fixados em Carnoy (ácido acético: clorofórmio: álcool 100% na proporção 1:3:6) por 30 minutos. Decorrido o tempo de fixação ocorreu o rompimento espontâneo do córion. Em seguida, os ovos foram lavados duas vezes em álcool 90% e transferidos para uma solução de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. A retirada da membrana vitelínica se deu com o auxílio de alfinetes entomológicos. Os embriões foram mantidos em solução tampão até posterior processamento.

2.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Ao menos seis amostras de embriões nos estádios de clivagem, segmentação, inversão e pré-larva, foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura. Após a coleta dos ovos, esses foram fixados e submetidos ao processo de retirada do córion, conforme descrito acima. Os que não passaram por esse processo foram fixados em uma solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,2M pH 7,4, por três horas, a 4°C. Decorrido o tempo de fixação, as amostras foram desidratadas em etanol e submetidas ao ponto crítico com CO₂ líquido. Na sequência, as amostras foram fixadas em suporte apropriado e metalizadas com ouro. Posteriormente, foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura.

2.3. RESULTADOS

2.3.1 OVIPOSIÇÃO E AMOSTRAGEM

Embora não tenham sido feitos experimentos relacionados à reprodução da espécie, durante a manutenção das aranhas para obtenção dos ovos, foram observadas algumas características, que são descritas a seguir. Verificou-se que o tempo para que ocorra a oviposição após o acasalamento pode variar de uma semana até alguns meses. Foi observado que este tempo depende de alguns fatores ambientais, incluindo a época do ano, uma vez que, mesmo mantidas em ambiente climatizado (29°C) e em condições ideais de umidade e alimentação, as aranhas dificilmente realizam cópula e não depositaram ovos no período entre abril e agosto de 2009. Uma mesma fêmea pode depositar ovos mais de uma vez, tendo realizado apenas uma cópula. Quando esse evento acontece o tempo decorrente entre uma postura e outra é de aproximadamente um mês.

No presente estudo, foi constatado que as temperaturas mais altas influenciam positivamente na oviposição, porém apenas nos meses de primavera e verão, que possivelmente sejam o período mais comum para a reprodução da espécie. No entanto, durante o tempo em que as aranhas-marrom normalmente não se reproduzem (outono/inverno), as temperaturas mais altas não tiveram nenhuma influência, sugerindo a existência de um ritmo biológico independente da temperatura.

Uma vez que se verificou uma maior frequência de oviposição nas fêmeas que copularam naturalmente no ambiente antes de serem coletadas, quando comparadas àquelas cuja cópula foi induzida em laboratório, foram realizadas freqüentes coletas de adultos para tentar sanar a falta de ovos no período supracitado. Estas coletas foram realizadas em quintais de residências na cidade de Curitiba e resultaram em um estoque de cerca de 150 aranhas adultas no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento (Departamento de Biologia Celular, UFPR). Mesmo assim, não houve sucesso na obtenção de ovos no período de maio a setembro.

A partir de setembro de 2009, no entanto, as aranhas passaram a colocar grande número de ovos. Além dos ovos depositados nas dependências do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, as ootecas provenientes das aranhas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos (Departamento de

Biologia Celular, UFPR) também passaram a ser utilizados no presente estudo. Com isso, obteve-se número suficiente de embriões para a conclusão das análises.

2.3.2 DESCRIÇÃO DOS ENVOLTÓRIOS DOS OVOS

O córion é composto de grânulos esféricos aderidos a uma banda contínua ao redor do ovo. Ao microscópio eletrônico de varredura, observou-se que os grânulos do córion apresentam tamanhos variados, estando os menores aderidos a uma superfície que acompanha o ovo (Fig. 8A), enquanto os maiores formam grumos mais salientes (Fig. 8B). Os grânulos do córion apresentam reação negativa ao azul de toluidina (Fig. 8E) e ao PAS (Fig. 8F) e positiva ao Ninhidrina-Schiff (Fig. 8G), indicando que são compostos de proteínas básicas.

A membrana vitelínica, situada logo abaixo do córion, apresentou-se, como uma linha muito delgada à microscopia de luz (Fig. 8H). Ao microscópio eletrônico de varredura, observou-se o envoltório vitelínico como uma membrana lisa que encobre todo o embrião (Fig. 8C e D).

2.3.3 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O desenvolvimento embrionário de *L. intermedia* foi dividido em 10 estádios de acordo com os quadros morfológicas observadas ao longo do tempo. A Tabela 1 sumariza os principais eventos que caracterizam cada estágio embrionário desta espécie. Em seguida, são descritas as principais características morfológicas que caracterizam cada um destes estádios.

2.3.2.1 Estádio 1: Zigoto (< 24h após a oviposição)

Logo após a oviposição, foi possível observar os grânulos de vitelo distribuídos de maneira homogênea por todo o citoplasma (Fig. 9A, 9B e 9C). Estes grânulos aparecem corados pela eosina (Fig. 9B) e fracamente corados com azul de toluidina (Fig. 9C). Apresentaram, ainda, reação positiva para o PAS (Fig. 1F) e Ninhidrina-Schiff (Fig. 1G).

Internamente ao envoltório vitelínico, encontra-se o citoplasma cortical ou periplasma (Fig. 9B), que forma uma camada contínua na periferia da célula. Nos cortes observadas, não foi possível verificar o núcleo, que, possivelmente localiza-se entre os grânulos de vitelo, em uma posição mais ou menos central.

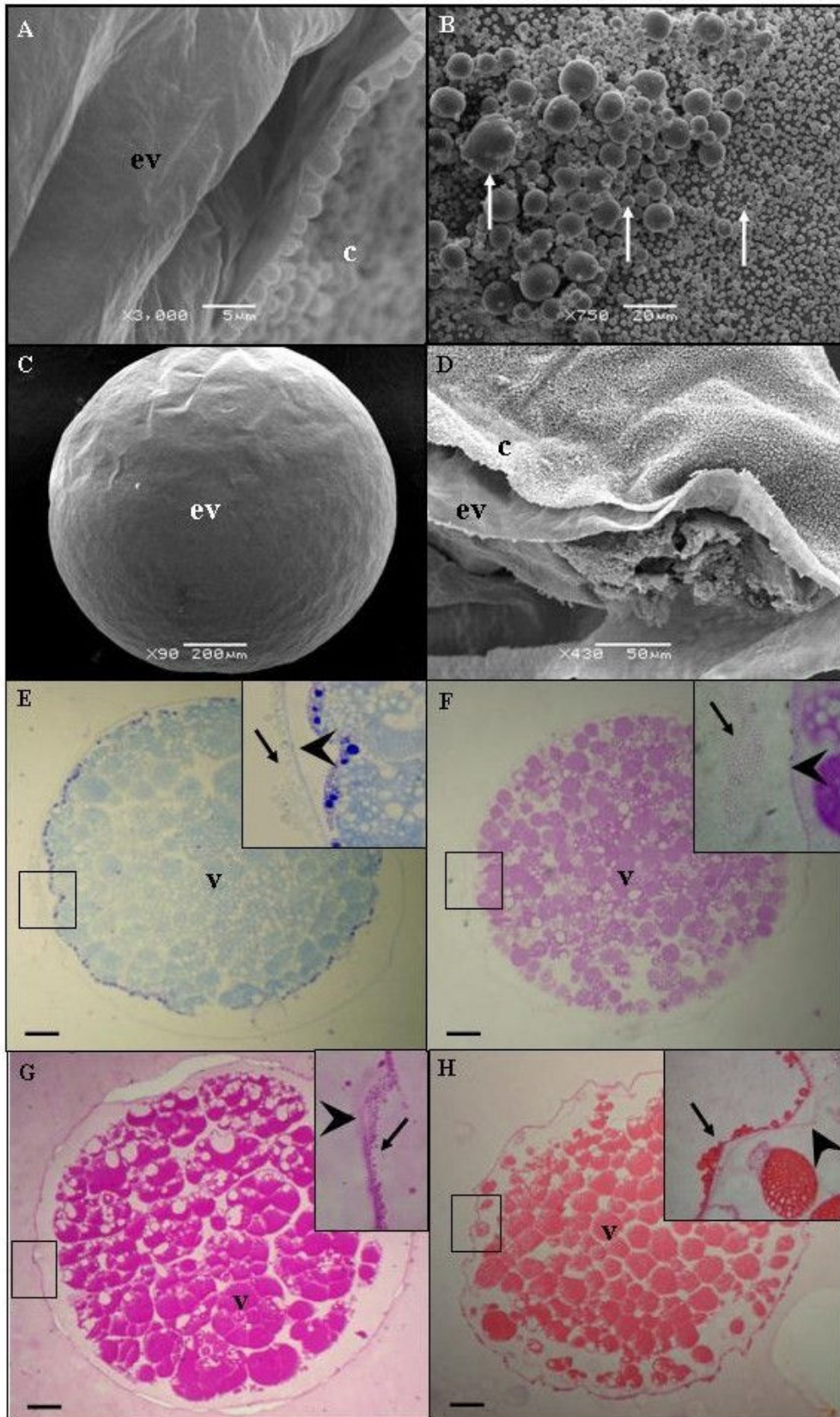


Figura 8. Envoltórios dos embriões de *Loxosceles intermedia*. A-D) Microscopia Eletrônica de Varredura.. E-H) Cortes histológicos. A) Observar a presença de grânulos pequenos aderidos sobre a superfície do córion. B) Notar a presença de grânulos de diversos tamanhos sobre o córion (setas). C) Embrião que teve o seu córion removido e apresenta apenas o envoltório vitelínico. D) Embrião cortado ao meio. Símbolos: c: córion; ev: envoltório vitelínico. E) Coloração azul de toluidina. F) Coloração PAS. G) Coloração Ninhidrina-Schiff. H) Coloração HE. Símbolos: Cabeça de seta: envoltório vitelínico; seta: córion; v: vitelo. Escala: 100 μ m. As inserções nas figuras são aumentos maiores das regiões indicadas por retângulos sobre as mesmas.

Tabela 1. Estádios do Desenvolvimento Embrionário de *Loxosceles intermedia*.

Estádio		dpo*	Principais eventos
1	Zigoto	< 1	- grânulos de vitelo distribuídos homogeneamente; - citoplasma cortical aparente.
2	Clivagem	1	- cariocinese - arranjo radial do vitelo.
3	Formação da blástula	2 – 4	- núcleos atingem a periferia do embrião; - formação da blastoderme sincicial; - celularização da blastoderme - presença de vitelócitos.
4	Contração da blástula	5 – 6	- alteração do formato da blástula de esférica para elíptica - aparecimento do espaço perivitelínico.
5	Formação do disco germinativo	7	- células se agrupam em um dos pólos do embrião formando o disco germinativo.
6	Gastrulação	8 – 12	- aparecimento da placa primitiva e do <i>cumulus</i> ; - migração do <i>cumulus</i> em direção a borda do disco germinativo.
7	Segmentação	14	- formação dos primórdios das pernas, pedipalpos, quelíceras e dos segmentos do abdômen.
8	Inversão	16 – 23	- formação de um sulco ventral na linha mediana; - deslocamento e fusão das paredes laterais do corpo na linha média dorsal; - a forma típica do corpo das aranhas é estabelecida.
9	Pré-larva	24	- ainda se apresenta imóvel e envolto pelo córion; - segmentação incompleta das pernas.
10	Eclosão	30	- rompimento do córion; - apresenta pouca mobilidade; - segmentação incompleta das pernas.

* dpo: dias após a oviposição (tempo aproximado)

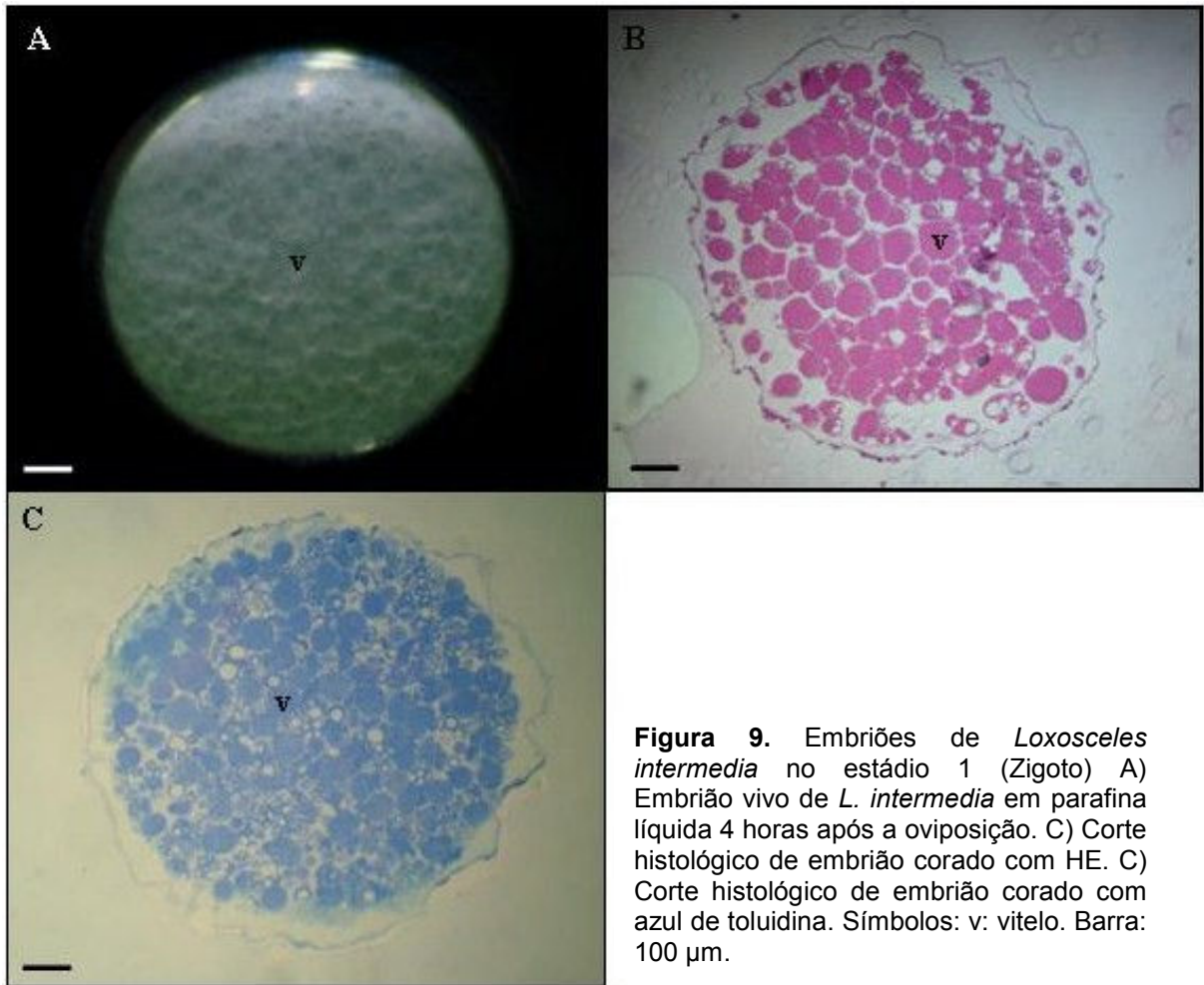


Figura 9. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 1 (Zigoto) A) Embrião vivo de *L. intermedia* em parafina líquida 4 horas após a oviposição. C) Corte histológico de embrião corado com HE. C) Corte histológico de embrião corado com azul de toluidina. Símbolos: v: vitelo. Barra: 100 µm.

2.3.2.2 Estádio 2: Clivagem (1 dpo)

A clivagem de *L. intermedia* é do tipo superficial e os núcleos localizados na região central do ovo são envolvidos por pouco citoplasma. Ao longo desse estágio, o vitelo sofre reorganização, sendo possível observar o arranjo radial de seus grânulos, bem como de porções de citoplasma (Fig. 10A), através das quais, possivelmente, os núcleos se deslocam para formar, em seguida, a blastoderme.

No interior do embrião é possível observar a presença de núcleos resultantes da cariocinese (Fig. 10B, 10C e 10 D). Cortes seriados, corados com HE, permitiram a localização de 10 núcleos reconhecidos por sua basofilia (Fig. 10C e 10D). Um desses núcleos estava localizado próximo à periferia do ovo claramente relacionado com o raio de citoplasma conectado ao periplasma (Fig. 10C). Os outros núcleos observados encontravam-se em porções de citoplasma localizado centralmente e envoltos por grânulos de vitelo (Fig. 10D).

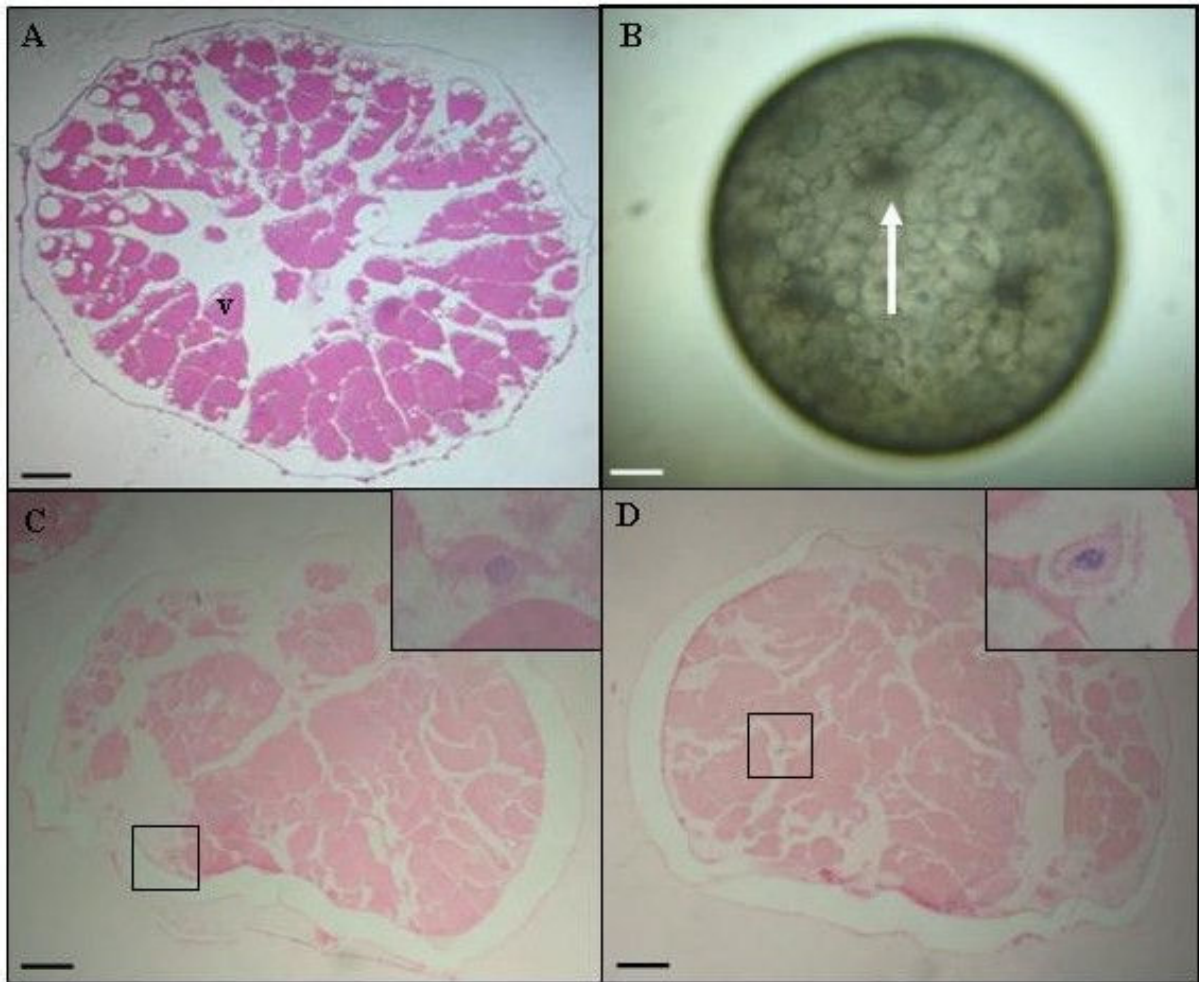


Figura 10. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 2 (Clivagem) A) Corte histológico corado com HE. Observar o arranjo radial do vitelo (v). B) Embrião em parafina líquida com 1 dpo. Notar a presença de núcleos (seta). C e D) Cortes histológicos corados com HE, evidenciando núcleos, que possivelmente estão migrando para a periferia do ovo. Barra: 100 μ m.

2.3.2.3 Estádio 3: Formação da Blastoderme (2 a 4 dpo)

Após a clivagem, os núcleos atingiram a periferia do ovo (sincício) e passaram a ser circundados por porções distintas de citoplasma, formando a blastoderme sincicial (Fig. 11A). Após este evento, ocorre a celularização da blastoderme (Fig. 11B), na qual se pode observar claras delimitações citoplasmáticas contendo os núcleos centralmente (Fig. 11C).

Foram observadas células grandes que não alcançaram a periferia do ovo, permanecendo no citoplasma central. Estas células, que são denominadas vitelócitos (Fig. 11D), possuem núcleo claro e são envolvidas por grânulos de vitelo. É interessante notar que o vitelo apresentou um aspecto mais granular, aumentando a quantidade de espaços correspondes a imagens negativas de gotículas lipídicas.

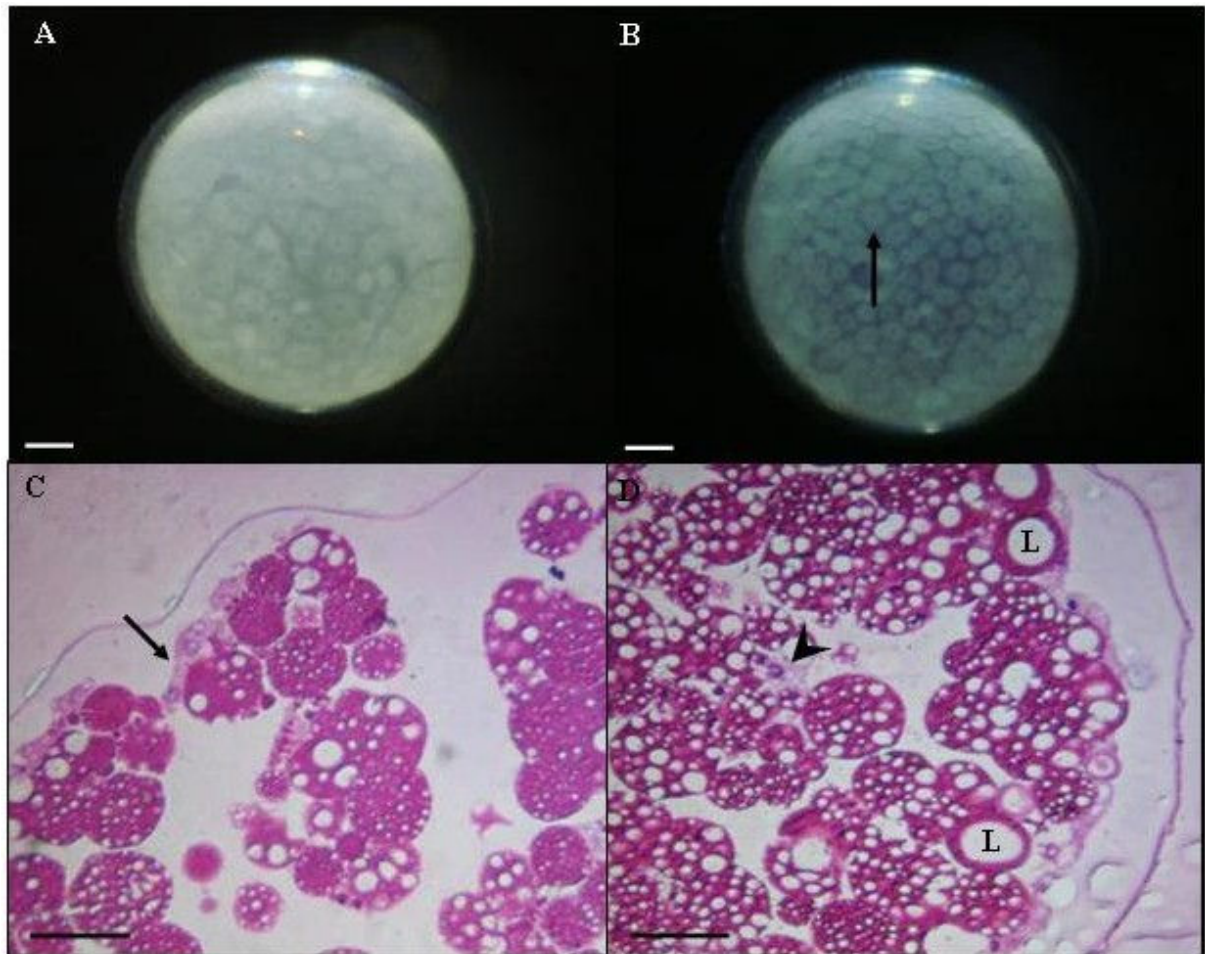


Figura 11. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 3 (Formação da Blastoderme). Embriões de *L. intermedia* em parafina líquida com A) 2 dpo: blastoderme sincicial e B) 4 dpo, celularização da blástula (blastoderme celular). Observar as células individualizadas (seta). C e D) Cortes histológicos de embriões em estágio de blástula (4 dpo) corado com HE. Notar a presença de células que constituem a blastoderme (setas). D) Corte de embrião evidenciando um vitelócito (cabeça de seta). L: imagem negativa de gotícula lipídica no vitelo. Barras: 100 μ m.

2.3.2.4 Estádio 4: Contração da Blástula (5 e 6 dpo)

Com o passar do tempo, foi observado que as células da blastoderme continuam se multiplicando e diminuindo simultaneamente de tamanho, de modo a manter o tamanho do embrião após vários ciclos celulares. Neste estágio, se iniciam movimentos morfogenéticos, que resultam na contração da blástula, levando à alteração de forma do embrião, que passa de esférica à elíptica (Fig. 12A e 12B). Uma vez que não ocorre alteração no córion, conforme esta contração acontece, o espaço perivitelino se torna mais amplo e preenchido por um líquido claro (líquido perivitelínico). O embrião assume uma posição excêntrica dentro dos envoltórios (Fig. 12A, 12B, 12C e 12D).

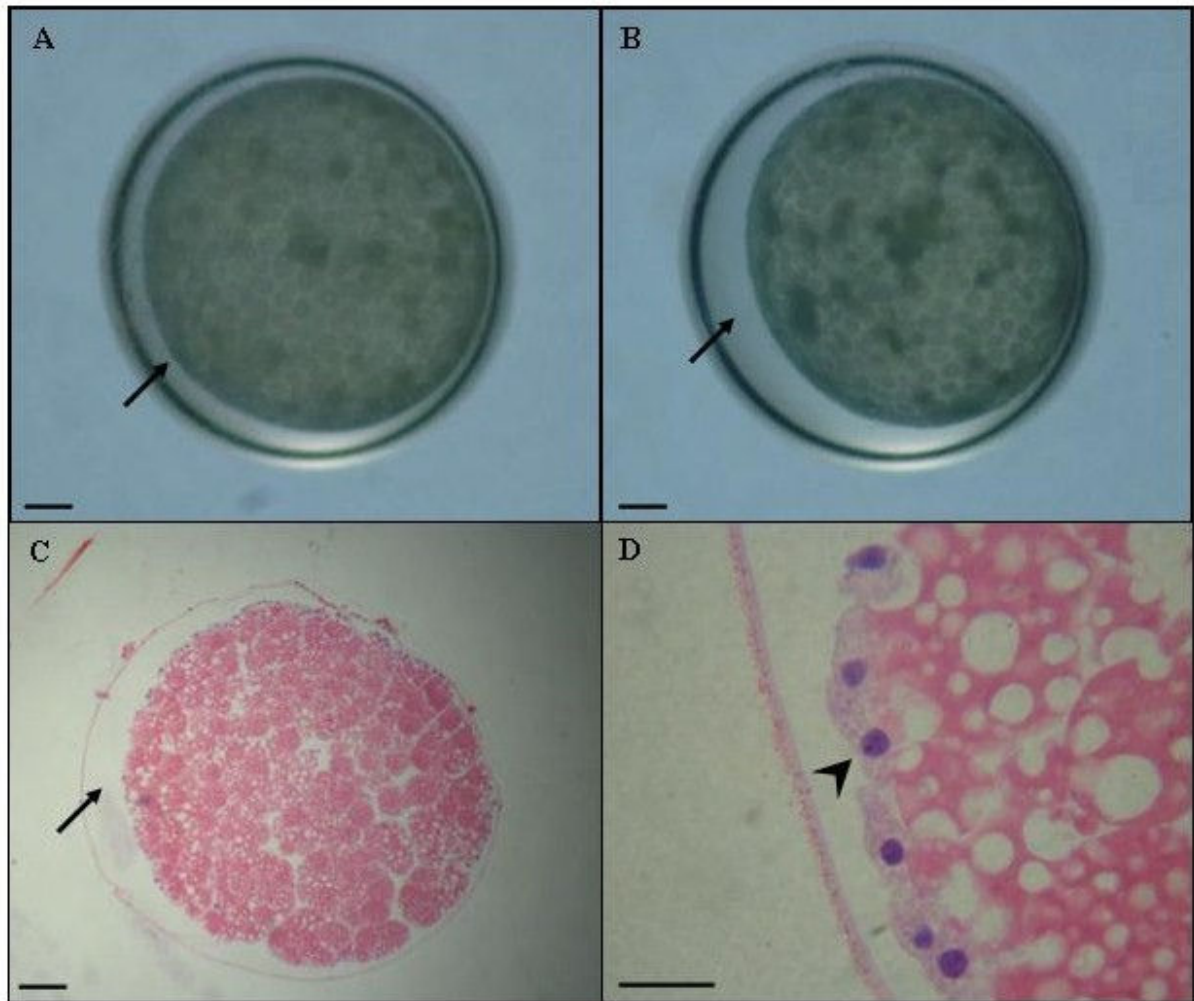


Figura 12. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 4 (Contração da Blástula) Embriões em parafina líquida com A) 5 dpo; início da contração da blástula. B) 6 dpo: contração tardia da blástula. Seta = espaço perivitelínico. C e D) Cortes histológicos de embriões com 5 dpo corados com HE. Cabeça de seta: células da blastoderme; seta: espaço perivitelínico. Barras: 100 μ m.

2.3.2.5 Estádio 5: Formação do disco germinativo (7 dpo)

Imediatamente após a contração da blástula, ocorre a polarização do embrião, sendo que, em conseqüência de movimentos morfogenéticos, algumas células se agrupam em um dos pólos, para formar o disco germinativo, no qual ocorre o processo de formação dos folhetos germinativos enquanto o vitelo se distribui por todo o restante do embrião (Fig. 13A, B e C). Estas células adquirirão características próprias, passando de pavimentosas a esféricas, com núcleos fortemente basófilos.

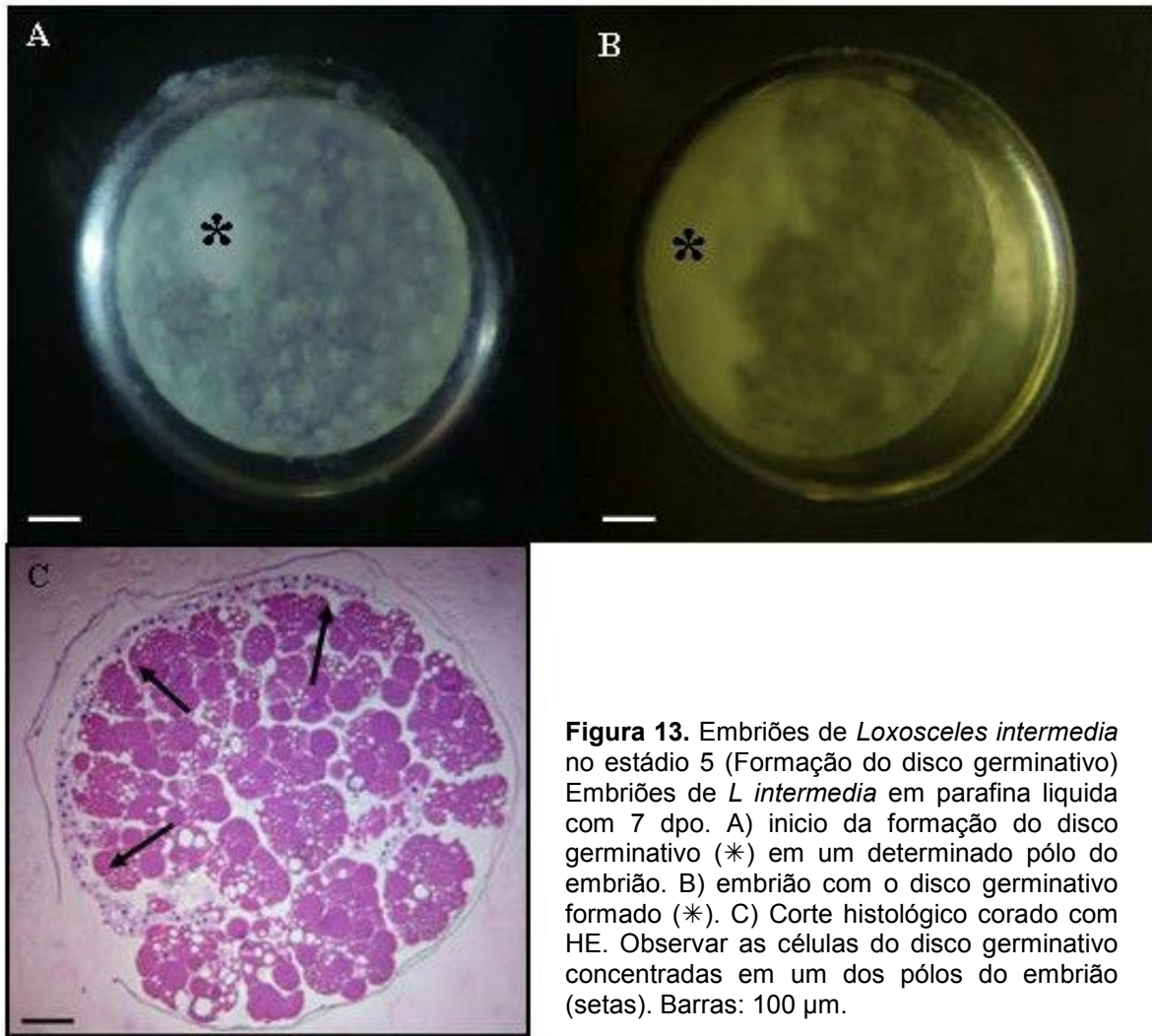


Figura 13. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 5 (Formação do disco germinativo) Embriões de *L. intermedia* em parafina líquida com 7 dpo. A) início da formação do disco germinativo (*) em um determinado pólo do embrião. B) embrião com o disco germinativo formado (*). C) Corte histológico corado com HE. Observar as células do disco germinativo concentradas em um dos pólos do embrião (setas). Barras: 100 μ m.

2.3.2.6 Estádio 6: Gastrulação (8 a 12 dpo)

Pode-se notar no disco germinativo, o aparecimento de um grupo de células (placa primitiva) (Fig. 14A). Próximo a essa placa primitiva aparece uma protuberância maior do epitélio de revestimento, que é chamado de *cumulus* (Fig 14B). Ao longo do estágio, o *cumulus* se desloca em linha reta em direção a borda do disco germinativo, em movimento chamado de extensão convergente (Fig. 14C e D).

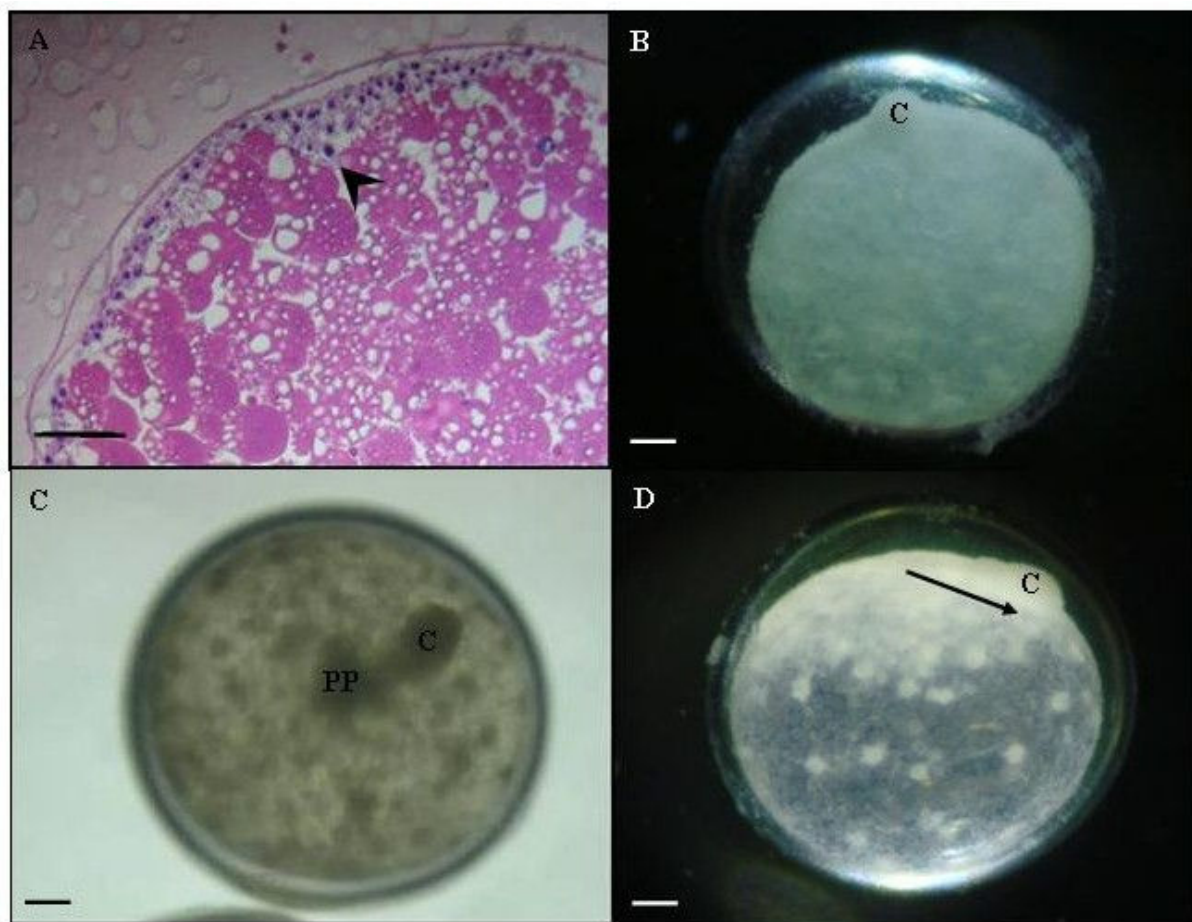


Figura 14. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 6 (Gastrulação) A) Corte histológico de embrião com 9 dpo. Notar a presença de células que formam a placa primitiva (cabeça de seta). Coloração H.E. B) Embrião em parafina líquida com 10 dpo. Observe o aparecimento do cumulus (C) no centro do disco germinativo. C e D) Embrião em parafina líquida com 12 dpo, migração do cumulus para a borda do disco germinativo. PP: placa primitiva; Seta: direção em que o cumulus migra. Barras: 100 μ m.

2.3.2.7 Estádio 7: Segmentação (13 - 15 dpo)

A partir do 13º dia após a oviposição, observou-se a formação da banda germinativa (Fig. 15A), onde as regiões cefálica e caudal do animal são estabelecidas. Partindo da banda germinativa, se deu o início da segmentação do embrião, com a formação de saliências discretas (Fig. 15B). Com o desenvolvimento, as saliências se projetam para fora, originando os primórdios das pernas, pedipalpos, quelíceras e os segmentos do abdômen (Fig. 15C, 15D, 15E, 15F, 15G e 15H). Em cortes histológicos se percebe que os grânulos de vitelo perdem seu aspecto vacuolizado e se apresentam de maneira mais homogênea (Fig. 16A, 16B, 16C).

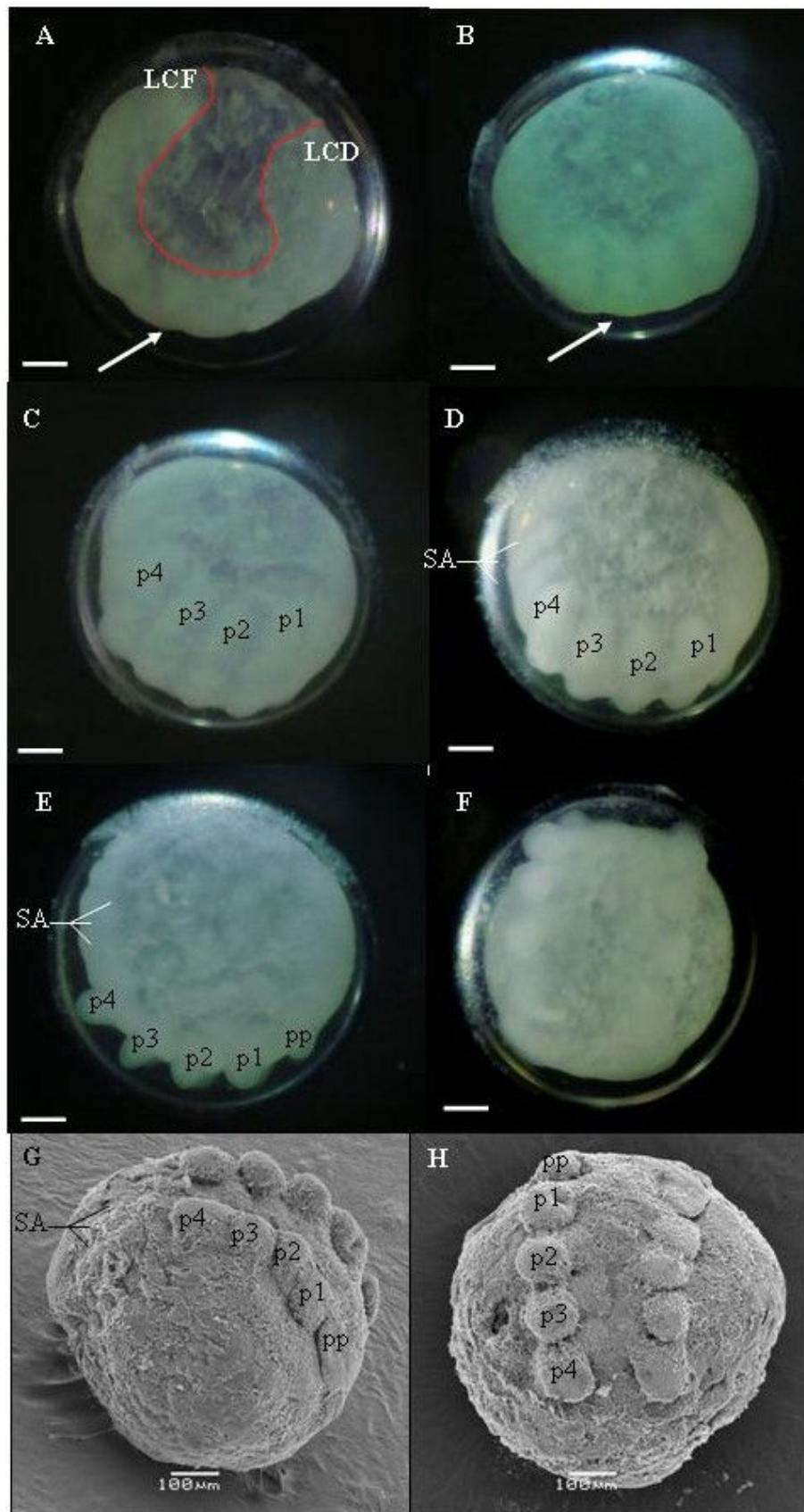


Figura 15. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 7 (Segmentação) Embriões em parafina líquida. A) 13 dpo, início da segmentação. A linha vermelha indica as bordas da banda germinativa. B) 14 dpo, vista lateral. C) 15 dpo, vista lateral. E) 16 dpo vista lateral F) 16 dpo vista ventral. Embriões em Microscopia Eletrônica de Varredura. G) 16 dpo, vista lateral. H) 16 dpo vista ventral. Seta: início da segmentação; p1, p2, p3 e p4: primórdios dos pares de pernas 1, 2, 3 e 4, respectivamente; pp: primórdio do pedipalpo; LCF: lobo cefálico; LCD: lobo caudal; SA: segmentos abdominais. Barras: 100 μm.

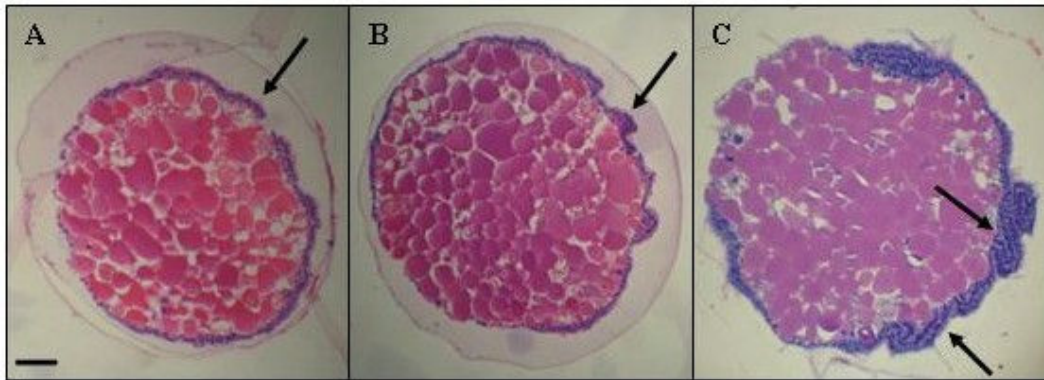


Figura 16. Cortes histológicos de embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 7 (Segmentação) . A) 14 dpo. B) 15 dpo. C) 16 dpo. Setas: segmentos das pernas sendo formadas. Coloração: HE Barra: 100 μ m.

2.3.2.8 Estádio 8: Inversão (16 a 23 dpo)

Em *L. intermedia*, o processo de inversão ocorre a partir do 16º dpo (Fig. 17A, 17B, 17C e 17D), quando há a formação de um sulco mediano. Conforme o sulco expande, observa-se o deslocamento de cada uma das laterais do embrião para a região dorsal, expondo, assim, a massa de vitelo ventralmente à linha mediana (Fig. 17E, 17F, 18A, 18B, 18C e 18D). Ao microscópio eletrônico de varredura, é possível visualizar a massa de vitelo sendo exposta bem como as laterais do corpo e a formação dos segmentos abdominais (Fig 18A, 18 B e 18D). As paredes laterais do corpo se fundem na linha média dorsal. Quando a forma típica do corpo das aranhas é estabelecida e o embrião encobre toda a massa de vitelo, chega ao fim o processo de inversão (Fig. 18E e 18F).

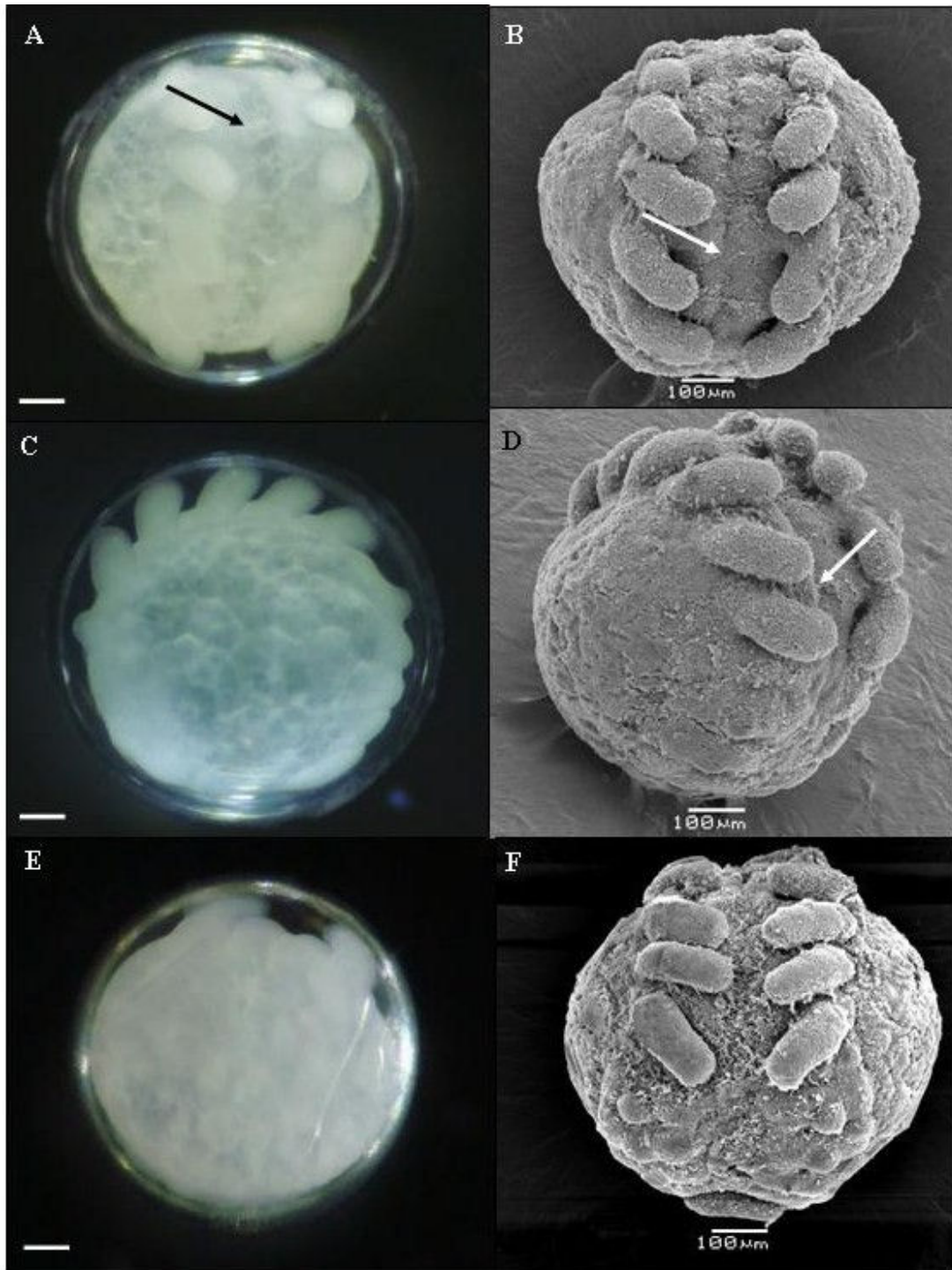


Figura 17. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 8 (Inversão) – I. Embriões em parafina líquida (A, C, E) e Microscopia Eletrônica de Varredura (B, D, F). A e B) 16 dpo, início da inversão (vista ventral), C e D) Vista lateral. E e F) 18 dpo (vista ventral). Setas: linha mediana ventral Barra: 100 μm.

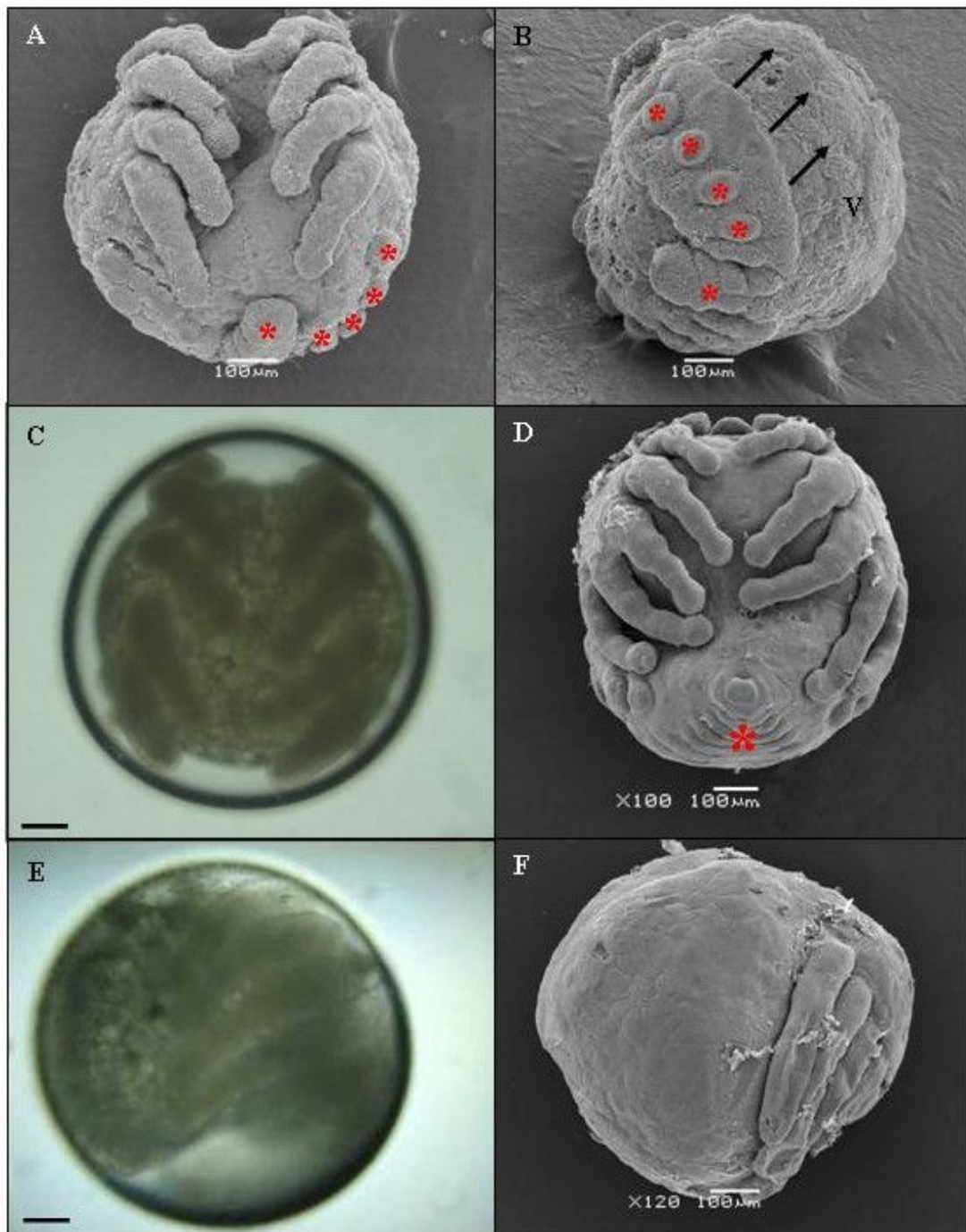


Figura 18. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 8 (Inversão) – II. Embriões em Microscopia Eletrônica de Varredura (A, B, D, F) e em parafina líquida (C, E). A) 20 dpo, embrião se encontra no meio do processo da inversão (vista ventral). B) 22 dpo, vista lateral. C e D) 23 dpo (vista ventral), E e F) 24 dpo, término da inversão (vista lateral). Seta: sentido que as bordas do embrião seguem até sua fusão na linha dorsal, (*): segmentos abdominais, V: massa de vitelo. Barras: 100 µm.

2.3.2.9 Estádio 9: Pré-larva (24 a 29 dpo)

O próximo estágio é chamado de pré-larva. Neste período, observa-se que o embrião ainda está envolto pelo córion, não possui movimentação e a segmentação das patas é incompleta (Fig.19A, 19C, 19E). Ao microscópio eletrônico de varredura,

pode-se observar que os segmentos abdominais e a região da boca já estão formados (Fig. 19B, 19D e 19F).

Também se nota que a pré-larva não possui a formação completa de órgãos, apresentando grande quantidade de vitelo na região do abdome (Fig. 20A, 20C, 20E e 20I), indicando que a alimentação continua sendo endógena.

A região do cefalotórax apresenta menor quantidade de grânulos de vitelo que a do abdome, porém, é rico em células pequenas, com citoplasma escasso, e com núcleos arredondados e intensamente basófilos (células do tipo I) (Fig. 20F). Em diversas regiões do cefalotórax estas células se organizam formando estruturas tubulares ou esféricas, correspondentes aos futuros órgãos ali presentes (tubo digestório, sistema circulatório, sistema nervoso entre outros), que de modo geral são amplamente ramificados (Fig. 20I e 20K).

Nesta região, verificam-se ainda agrupamentos de células alongadas com citoplasma acidófilo e núcleos alongados e cromatina com aspecto granular (células do tipo II) (Fig. 20H). Estas células possivelmente são células precursoras de miócitos, que se agrupam para formar músculos em regiões específicas.

Também é possível observar o cérebro sendo formado no cefalotórax da pré-larva. Esta região possui uma grande quantidade de células do tipo I, elas se organizam de maneira que formam uma estrutura semelhante a um “H”, e ao redor dessa região observamos pequenas estruturas que parecem formar as ramificações existentes no sistema nervoso das aranhas (Fig. 20A, 20B, 20C, 20D e 20E).

Foi verificada ainda a presença de pequenos agrupamentos de células (células do tipo III) (Fig. 20G) com diâmetro maior que a maioria das células do cefalotórax (células do tipo I), com citoplasma abundante e acidófilo e núcleo com aspecto mais eucromático que a maioria das células desta região (células do tipo I).

O abdome é circundado por uma única camada de células pavimentosas. É preenchido em sua maioria por grânulos de vitelo, havendo pequenos grupamentos de células com aspecto semelhante àquelas predominantes no cefalotórax (células do tipo I). Estas são mais abundantes na região de ligação entre o cefalotórax e abdome.

Verificou-se também a presença, tanto no cefalotórax quanto no abdome, de células gigantes com amplo citoplasma acidófilo e um núcleo grande com aspecto granular. Acredita-se se tratar dos vitelócitos (Fig. 20J). Estas células se localizam necessariamente na interface dos grânulos de vitelo com os grupos de células.

As pernas e pedipalpos também são preenchido por células semelhante àquelas predominantes no cefalotórax (células tipo I). na região central destes apêndices, frequentemente se observa uma ou mais cavidades, nas quais muitas vezes se observa a presença de pequenos grupos de células do tipo II.

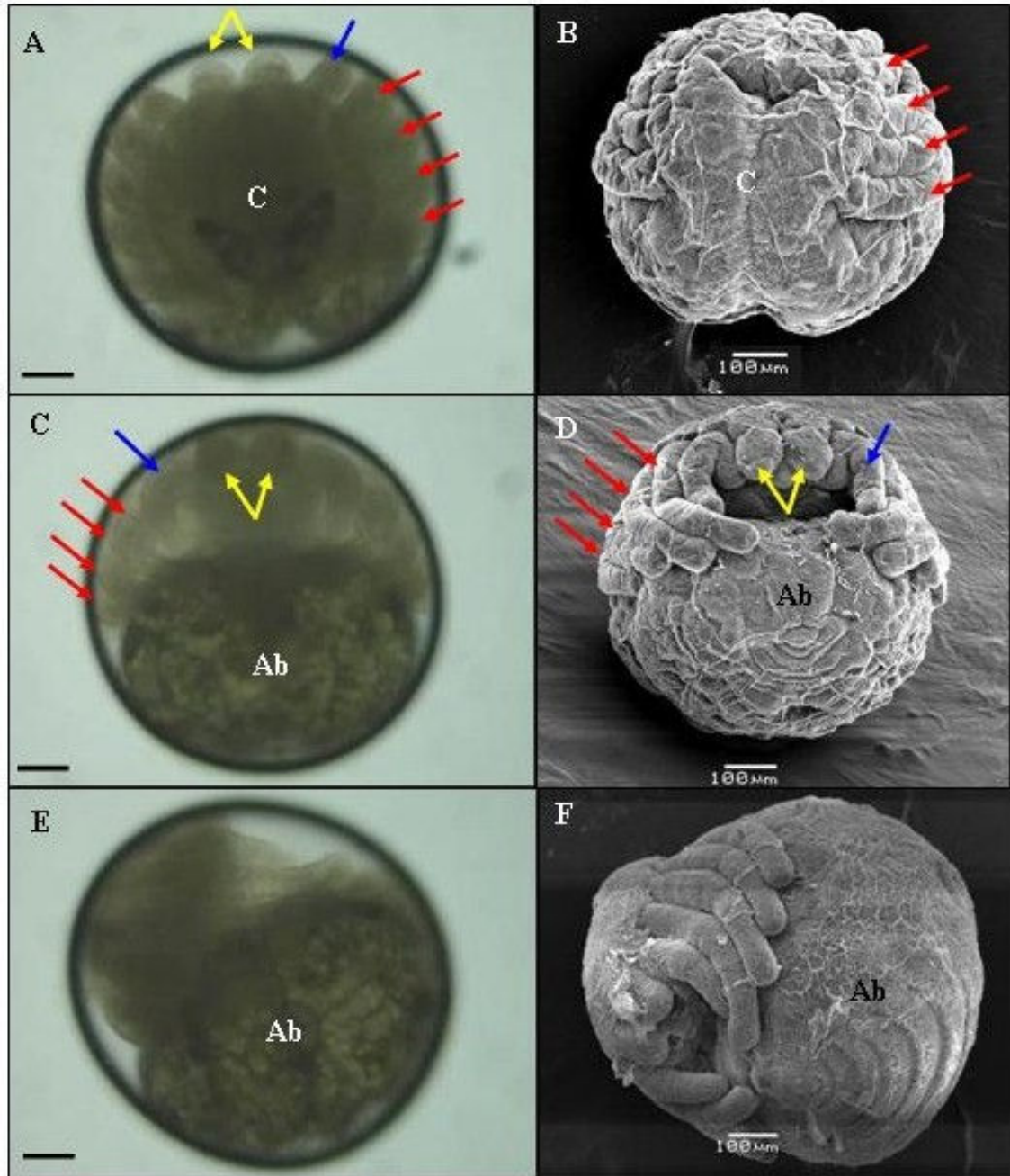


Figura 19. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 9 (Pré-larva - 26 dpo) Embriões em parafina líquida (A, C, E) e Microscopia Eletrônica de Varredura (B, D, F). A e B) Vista lateral. C e D) Vista dorsal. E e F) Vista ventral.). Ab: abdome; C: cefalotórax; seta amarela: quelíceras; seta azul: pedipalpo; setas vermelhas: pernas. Barra: 100 µm.

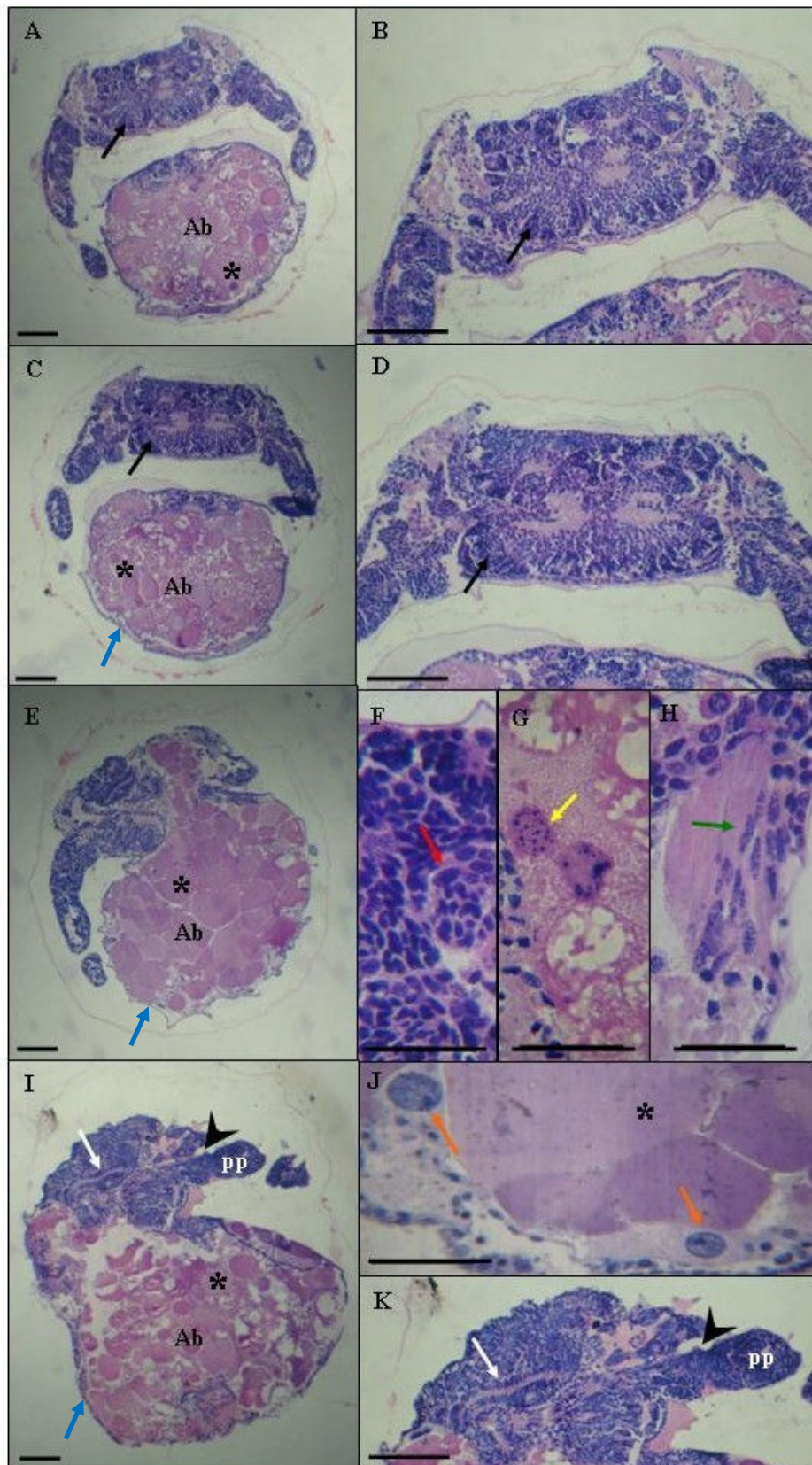


Figura 20. Cortes histológico de embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 9 (pré-larva) A, B, C e D) Cortes transversais, mostrando o arranjo de células que possivelmente irão formar o cérebro (setas). E) Corte longitudinal. F) Células do tipo I (seta vermelha) – barra: 200 µm. G) células do tipo III (seta amarela) – barra: 200 µm. H) Células do tipo II (seta verde) – barra: 200 µm. I e K) Corte longitudinal, evidenciando o arranjo de células que possivelmente irão formar o tubo digestório (seta branca), cabeça de seta: boca, pp: pedipalpo. J) vitelócitos (seta laranja) – barra: 200 µm. Ab: região do abdome; (*): vitelo, seta azul: células pavimentosas que circundam o abdome. Coloração: HE. Demais barras:

2.3.2.10 Estádio 10: Eclosão (30 dpo)

Antes da eclosão, o córion se apresenta mais frágil. Tal fato foi observado devida a maior facilidade na sua retirada quando os ovos estão prestes a eclodir.

No momento da eclosão, os embriões ainda se encontram no estágio de pré-larva (Fig. 21 A, 21B e 21C). Neste momento os embriões ainda possuem segmentação incompleta das pernas, alimentação endógena, e pouca movimentação. Após a ruptura do córion, a pré-larva realiza movimentos sutis até remover completamente o envoltório.

Após alguns dias, ocorrem modificações na pré-larva, como observado na Fig. 21D, onde nota-se a segmentação completa das pernas, aparecimento de poucos pelos no corpo e aumento da capacidade de movimento, atingindo, assim, o estágio de larva.

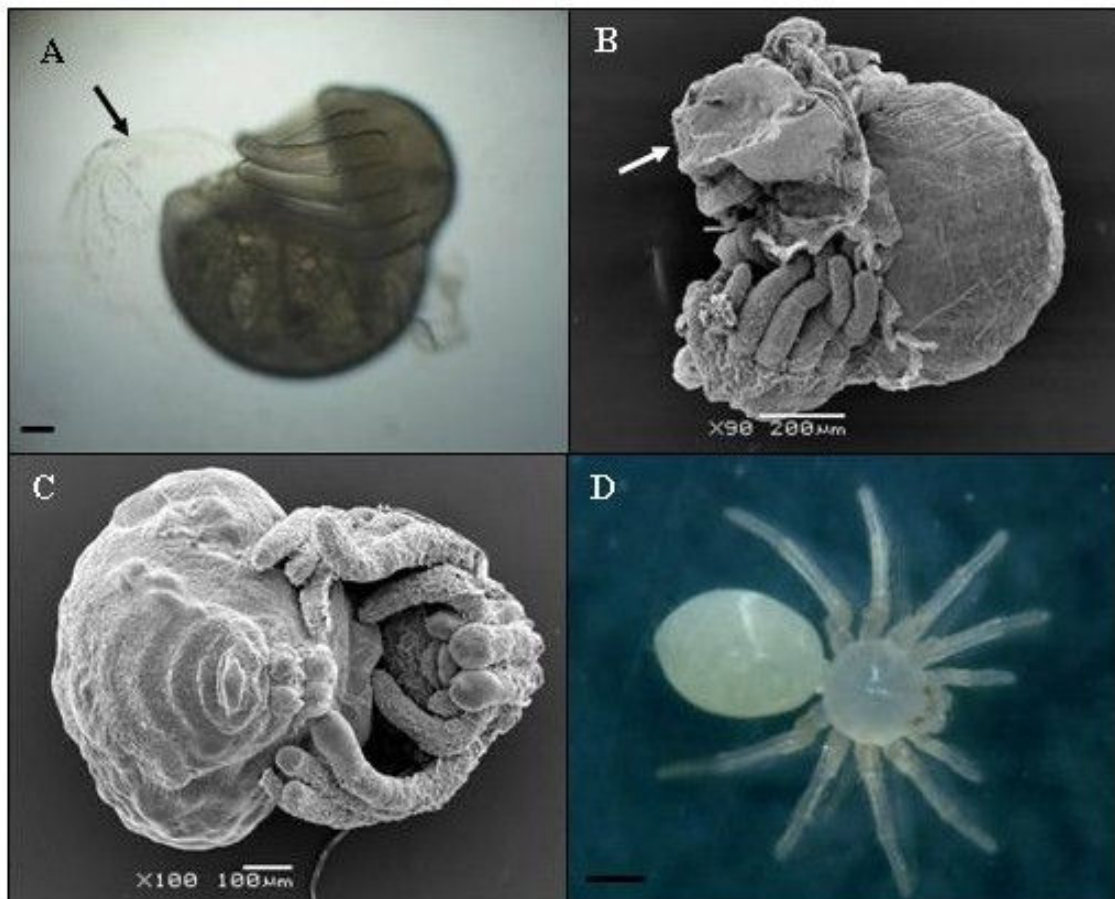


Figura 21. Embriões de *Loxosceles intermedia* no estágio 10 (Eclosão) e Larva. A e B) Pré-larva de *L. intermedia* em parafina líquida e MEV, respectivamente, logo após a eclosão – vista lateral. C) Pré-larva sem o córion em Microscopia Eletrônica de Varredura – vista ventral. D) Aranha em estágio de larva. Seta: córion rompido. Barra fig.B: 200 µm, Demais barras: 100 µm.

2. 4 DISCUSSÃO

2.4.1 Descrição dos envoltórios dos ovos

Os ovos dos artrópodes possuem duas camadas de revestimento: o córion e a membrana vitelínica. Esse padrão de revestimento é seguido na espécie *L. intermedia*. O córion é mais externo e funciona como uma barreira de proteção entre o ovo e meio. Sua constituição pode variar quando se compara diversos grupos de insetos, crustáceos e aranhas. No entanto verificou-se que os envoltórios sempre se apresentam altamente resistentes, sendo que esse padrão foi observado em insetos *Lytta viridana* (REMPEL, 1965; SWENNY *et al.*, 1967; GERRITY *et al.*, 1987); *Drosophila* sp. (PASCUCCI *et al.*, 1996).

Os ovos de insetos que pertencem à família Acrididae possuem uma camada acima do córion que é constituído por um material amorfo e mucoso que gradualmente vai desaparecendo (VISCUSO, 1984). Além desta camada mucosa, existe uma outra camada constituída inteiramente por grânulos proteínáceos que permanecem na superfície do ovo até a eclosão.

Nos ovos de *L. intermedia* o córion também é constituído por componentes possivelmente de natureza protéica, uma vez que se cora intensamente pela eosina e pela Ninhidrina-Schiff (que evidencia proteínas básicas). Por outro lado, estes grânulos apresentaram reação negativa ao PAS, confirmando que não são formados por carboidratos.

Ao microscópio eletrônico de varredura, o córion de *L. intermedia* apresenta grânulos esféricos de vários tamanhos. Humphreys (1983) analisou o córion de quatorze espécies de aranhas pertencentes a oito famílias e constatou que seu aspecto granular parece ser comum neste grupo, como constatado em *Pholcus phalangioides*, cujo córion apresenta um padrão de distribuição de seus grânulos similar ao descrito no presente trabalho para *L. intermedia*.

A membrana vitelínica se apresenta como uma linha delgada abaixo do córion. Rempel (1957) sugere que o controle da entrada do espermatozóide deve ser feito pela membrana vitelínica já que ele passaria sem grandes dificuldades pelo córion. O controle da fecundação pela membrana vitelina é um fato comum não apenas nos artrópodes, mas na maioria dos animais (GILBERT, 2006)

2.4.2 Desenvolvimento embrionário

2.4.2.1 Estádio 1: Zigoto (< 24h após a oviposição)

Embora a maioria dos autores relatem que a fertilização em aranhas ocorre após a oviposição, Suzuki (1995) relata a presença do núcleo do espermatozóide dentro do ovo de *Achaearanea*, quando este se encontra ainda no oviduto, sugerindo que a fertilização tenha ocorrido dentro do corpo da fêmea.

De acordo com Foelix (1996), uma hora após a oviposição o núcleo espermático já está se movendo em direção ao centro do ovo. Neste momento o pronúcleo feminino acaba de completar a segunda divisão e também está a caminho do centro do ovo. Montgomery (1909) e Rempel (1957) observaram que para *Latrodectus mactans*, a fusão do pronúcleos masculino e feminino ocorre aproximadamente quatro horas após a oviposição. No desenvolvimento embrionário do inseto *Ephemera japonica*, a formação do zigoto ocorre 5 a 6 horas após a oviposição e a fertilização é completada (TOJO e MACHIDA, 1998).

Logo após a oviposição percebeu-se que em *L. intermedia* os grânulos de vitelo dispostos de maneira homogênea por todo o ovo, e que logo abaixo do envoltório vitelínico se encontra o citoplasma cortical ou periférico. Como não visualizamos os pronúcleos masculino e feminino nos ovos coletados logo após a postura, não podemos afirmar se eles já estavam fertilizados.

2.4.2.2 Estádio 2: Clivagem (1 dpo)

Os ovos da aranha *L. intermedia* são do tipo centrolécitos, isto é, o vitelo está localizado no centro do ovo. Outros grupos de artrópodos como a *Macrobrachium acanthurus* (Crustacea) (BRESSAN e MÜLLER, 1997); *Ephemera japonica* (Insecta) (TOJO e MACHIDA, 1998) e *Drosophila melanogaster* (Insecta) (GILBERT, 2006) também apresentam esta disposição central do vitelo.

Gilbert (2006) afirma que, aliado a outros fatores, o vitelo pode influenciar o padrão de clivagem de uma espécie, uma vez que a presença dele em grande quantidade pode impedir a divisão total do ovo.

Em *Drosophila*, quinze minutos após a entrada do espermatozóide se forma o zigoto e a primeira divisão ocorre dentro do ovo. As divisões nucleares ocorrem sincronicamente. Durante as sete primeiras divisões os núcleos são rodeados de citoplasma e a partir da nona divisão os núcleos começam a migrar para a periferia do ovo (TURNER e MAHOLWALD, 1976).

De acordo com Tojo e Machida (1998), para *Ephemera japonica*, a primeira clivagem ocorre aproximadamente 10 horas após a fertilização, sendo que as demais clivagens acontecem em um intervalo de 9 horas. E após a sexta clivagem muitos núcleos já se encontram no periplasma. Em *Agelena labirintica*, a clivagem se inicia aproximadamente 8 hpo. Oito núcleos podem ser observados entre o centro e a periferia do ovo 16 hpo (HOLM, 1952). Em *Latrodectus mactans*, a clivagem começa 9 horas após a fertilização, sendo que esta ocorre 3 a 4 hpo. Nas quatro primeiras clivagens, o padrão de divisão é regular e sincrônico. Da quinta divisão em diante esse padrão se torna irregular (REMPEL, 1957).

O padrão de clivagem superficial é seguido na maioria dos artrópodos e já foi observado em insetos como, por exemplo, *Lytta Viridiana* (Sweeny *et al.*, 1967), *Ephemera japonica* (TOJO e MACHIDA, 1998) e *Drosophila melanogaster* (TURNER e MAHOWALD, 1976). Porém, em outros insetos e outros artrópodos como ácaros, crustáceos e até mesmo algumas espécies de aranhas, o padrão de clivagem pode ser um pouco modificado. Como exemplo, o crustáceo *Macrobrachium carcinus*, segue o padrão de clivagem superficial até o estágio de 16 células, entre os estádios de 16 a 32 células seguem o padrão de segmentação total, permanecendo assim até atingir 128 células, no qual não se visualizam os limites celulares e o desenvolvimento embrionário segue o modelo de segmentação superficial (Müller, 1984). Suzuki e Kondo (1995) relataram que, no desenvolvimento embrionário inicial da aranha *A. japonica*, devido às invaginações das membranas celulares e ao arranjo piramidal do vitelo, ocorre um tipo especial de segmentação total (holoblástica). Um outro tipo de segmentação é a que ocorre em *Pedetontus unimaculatus*, descrita por Machida *et al.* (1990), onde até o estágio de 500 núcleos a clivagem é do tipo total. A partir desse estágio ocorre a transição para a clivagem superficial.

Em *L. intermedia* o vitelo sofre rearranjo à medida que o desenvolvimento progride. Sendo possível observar o arranjo radial dos grânulos de vitelo, que provavelmente é consequência da organização de raios de citoplasma que se dirigem para a periferia do ovo. Esses raios de citoplasma são usados pelos núcleos em mitose que migram gradualmente para a região periférica do ovo.

A clivagem de *L. intermedia* é do tipo superficial. Os núcleos se dividem, mas o citoplasma ao seu redor não acompanha esse ciclo. Wolf (1976) e Gilbert (2006) chamam o conjunto formado pelo citoplasma e os núcleos resultantes da clivagem de enérgides, que são mantidos em associação devido à interação com os

microfilamentos e microtúbulos. Depois de algumas divisões, as enérides migram para a periferia. Quando esses núcleos atingem a periferia são envolvidos pelo citoplasma periférico. Foram visualizados cerca de 10 núcleos no embrião de *L. intermedia* 24 h após a fertilização.

2.4.2.3 Estádio 3: Formação da Blastoderme (2 a 4 dpo)

Quando os núcleos atingem a superfície do ovo de *L. intermedia*, tem início a formação da blastoderme sincicial e, algum tempo depois, a blastoderme celular. Em que as células são pavimentosas e possuem núcleos grandes.

Tekesue *et al.* (1980) relataram que, no inseto *Bombyx mori* é possível visualizar microprojeções na superfície do ovo quando os núcleos chegam à periferia. Em *L. intermedia* não foi visualizado nada semelhante com as técnicas empregadas, pois a superfície do ovo apresentou-se lisa em todas as observações feitas no decorrer das clivagens.

O processo de formação da blástula de *L. intermedia* é longo se comparado com outras aranhas. Chaw *et al.* (2007), relataram que, em *Zygiella x-notata*, a blastoderme se forma 18 hpo. Rempel (1957) observou para *Latrodectus mectans* que a blastoderme sincicial ocorre 25 hpo e após cinco horas começam a se formar as membranas celulares (citocinese). Para *Agelena labirintica* as células se individualizam 35 hpo, formando a blastoderme com células grandes e achatadas que envolvem toda a massa de vitelo (HOLM, 1952).

No presente estudo, verificou-se que esse processo ocorre aproximadamente em 96 horas em embriões de *L. intermedia*. Para outros artrópodos como, por exemplo, as abelhas, a blastoderme forma-se 30 hpo, sendo que os autores Fleig e Sander (1985) consideram este um período longo.

Sobre o desenvolvimento embrionário de aranhas, vários autores se referem a um tipo de célula que permanece entre os grânulos de vitelo, o vitelócito, o qual engloba ativamente o vitelo (Montgomery, 1909; Holm, 1952; Rempel, 1957; Lambert, 1909). Já outros autores referem-se a estas células como derivados da blastoderme da qual se desprendem.

Os vitelócitos não estão presentes apenas no desenvolvimento embrionário de aranhas, mas também em muitos insetos. Em *Ephemera japonica* eles aparecem assim que a blastoderme é formada (TOJO e MACHIDA, 1998). No desenvolvimento de *Pedetontus unimaculatus*, o autor descreve dois tipos de vitelócitos: os vitelócitos

primários que são formados logo quando a blastoderme é formada e os vitelócitos secundários que ocorrem adjacentes à blastoderme (MACHIDA *et. al*, 1990).

As observações do presente estudo, provavelmente estão mais de acordo com as de Holm (1952) que as descreve como “células de vitelo”, resultantes de núcleos que permanecem em localização mais central, mergulhados em porções remanescentes do citoplasma.

2.4.2.4 Estádio 4: Contração da Blástula (5 e 6 dpo)

Assim que a blastoderme é formada, tem-se o início de um outro estágio chamado de contração da blástula. Suzuki e Kondo (1994) dividem a contração da blástula em duas etapas: primeiro a contração do vitelo seguida da contração da blastoderme.

Yoshikura (1972) descreve para a aranha *Ummidia fragaria* que, à medida que acontece a contração da blástula, ocorre o aparecimento de um líquido claro, o qual Foelix (1996) chama de líquido perivitelínico e que, à medida que as células se dirigem para um dos pólos do ovo, a quantidade de líquido perivitelínico se torna mais evidente. Segundo Suzuki e Kondo (1995), em *Achaearanea japonica* a contração da blástula ocorre duas a três horas após a formação da blastoderme, quando é observado o aparecimento do espaço perivitelínico.

Para *L. intermedia* foi possível visualizar este estágio quando os embriões estavam mergulhados em parafina líquida, meio no qual o córion fica completamente transparente e permite a observação do embrião vivo, demorando cerca de 24 horas após a formação da blástula.

2.4.2.5 Estádio 5: Formação do disco germinativo (7 dpo)

Suzuki (1995) relataram que a concentração das células da blastoderme no estágio de contração da blástula pode estar relacionado com a formação das células do disco germinativo. Nas observações dos embriões de *L. intermedia* em parafina líquida pode-se acompanhar a movimentação que resulta na concentração das células em um dos pólos do ovo, bem como o deslocamento do vitelo para a área restante. Em cortes histológicos, foi verificado que o disco germinativo é constituído por células localizadas como uma banda que repousa sobre o vitelo.

Assim que é formado o disco germinativo, as células perdem suas características das células da blastoderme que eram pavimentosas e passam a adquirir características celulares próprias. Em *A. japonica* as células passam a ser

esféricas e ficam no pólo superior do ovo (SUZUKI e KONDO, 1995) enquanto que, em *Latrodectus mactans* as células que eram pavimentosas passam a ter a forma colunar (REMPEL, 1957). Em *L. intermedia* as células que eram pavimentosas na blastoderme passam a ser esféricas, com núcleos com intensa basofilia e, citoplasma eosinofílico.

2.4.2.6 Estádio 6: Gastrulação (8 a 12 dpo)

Durante a gastrulação, há a formação dos folhetos embrionários ectoderme, mesoderme e endoderme. Segundo Chaw *et al.* (2007), estudos com aranhas mostram que os embriões internalizam dois tipos distintos de células. Primeiramente, há a internalização de uma parcela da blastoderme, formando uma pequena região de células chamada de placa primitiva. Associado à placa primitiva, uma segunda pequena população de células forma o *cumulus*. Esse padrão é seguido em *L. intermedia*, na qual foi observada a formação da placa primitiva e do *cumulus* por meio da observação dos embriões em parafina líquida.

Segundo Akiyama-Oda e Oda (2003), durante a formação da placa primitiva há um recuo, que geralmente é chamado de blastóporo. Com as técnicas utilizadas no presente estudo, não foi possível constatar a ocorrência desse recuo em *L. intermedia*.

As células do *cumulus* migram até a periferia do disco germinativo, enquanto que as células que vão constituir a mesoderme e a endoderme continuam a ser internalizadas a partir da blastoderme. Este padrão geral é seguido pela maioria das aranhas araneomorfas e é considerado o modelo canônico da gastrulação em aranhas (ANDERSON, 1973; FOELIX, 1996). Este processo pelo qual o *cumulus* passa quando migra do centro do disco germinativo para a periferia é chamado de extensão convergente.

De acordo com Chaw *et al.* (2007), a gastrulação da aranha *Zygiella x-notata* é dividida em três fases. A fase I compreende a formação do blastóporo, que envolve o ingresso de pelo menos 20 células da blastoderme. A fase II começa quando as células que formam o *cumulus* começam a migrar para a periferia do disco germinativo. E a fase III envolve um mecanismo diferente, o qual formará o lobo caudal.

2.4.2.7 Estádio 7: Segmentação (14 - 15 dpo)

Após a formação do lobo caudal, o disco germinativo se separa em duas partes que migram em direções opostas, dando origem a uma banda germinativa (Holm, 1952, 1954; Rempel, 1957; Suzuki e Kondo, 1995; Akiyama-Oda e Oda, 2003). Esta banda germinativa alonga-se em torno do ovo até que seus prolongamentos anterior e posterior quase se tocam (CHAW e *al.*, 2007; McGREGOR *et al.*, 2008). Nos embriões de *L. intermedia* em parafina líquida foi possível observar a presença desta banda germinativa ao redor do ovo. A partir da banda germinativa são formados os segmentos abdominais, das pernas, quelíceras e pedipalpos.

É durante este estágio que o plano básico do corpo dos artrópodos é definido. Segundo Akiyama-Oda e Oda (2008), um eixo de simetria bilateral pode ser colocado paralelamente a linha mediana da banda germinativa, e é chamado normalmente de eixo ântero-posterior. Já, o eixo perpendicular que vai do tecido extra-embrionário até a linha média da banda germinativa é denominado eixo dorso-ventral.

As modificações nestes eixos embrionários podem ocorrer naturalmente ou serem induzidas experimentalmente (HOLM 1952; SEKIGUCHI 1957; SEITZ 1970; ITOW *et al.* 1991; SEKIGUCHI 1999; AKIYAMA-ODA e ODA 2006). McGregor *et al.* (2008) mostraram que a ausência do gene *Wnt8* causa a ampliação do eixo ântero-posterior dos segmentos das pernas 3 e 4 e a perda dos segmentos abdominais. Para *L. intermedia* não existe até o momento nenhum estudo que defina esta padronização dos eixos embrionários em nível molecular.

De acordo com Chen *et al.*, (2004), o grupo dos quelicerados possui uma segmentação corporal específica que outros artrópodes não apresentam: a região anterior, ou prossoma, e a região posterior ou opistossoma. Na região do prossoma são encontrado sete segmentos, o qual engloba os segmentos oculares, os segmentos que possuem as quelíceras, pepipalpos e quatro pares de pernas.

2.4.2.8 Estádio 8: Inversão (16 a 23 dpo)

Após a gastrulação outro notável movimento morfogenético ocorre, é a inversão. Segundo Foelix (1996), o processo de inversão ocorre na maioria das aranhas, exceto as Mesothelae e certas espécies da Orthognatha. Na embriologia das aranhas, a inversão significa que a banda germinativa, que inicialmente se localizava em uma metade do embrião, se separa longitudinalmente em duas

metades por um sulco que aparece na linha média da banda germinativa. Este sulco foi denominado de sulco ventral (ANDERSON, 1973).

As duas metades da banda germinativa são então afastadas uma da outra pelo alargamento ventral do sulco, atingindo finalmente uma posição na lateral do embrião (HOLM, 1952; REMPEL, 1957; YOSHIKURA, 1972; SUZUKI e KONDO, 1995). Posteriormente, uma camada fina da epiderme começa a crescer no lado dorsal do embrião para unir as duas metades da banda germinativa. Este processo é chamado de encerramento dorsal, no final do qual a forma típica do corpo da aranha é estabelecida (HOLM, 1952; REMPEL, 1957; YOSHIKURA, 1972). No presente estudo, verificou-se que os embriões de *L. intermedia* passam pelo estágio de inversão conforme descrito pelos autores citados anteriormente.

2.4.2.9 Estádio 9: Pré-larva (24 a 29 dpo)

Segundo Foelix (1996), no estágio de pré-larva apesar do embrião já possuir a forma característica do corpo da aranha, ainda não possuem todas as características morfológicas típicas da espécie, além de ainda apresentam alimentação endógena (vitelo).

Em embriões de *L. intermedia* através da utilização da parafina líquida, percebeu-se que o tamanho do embrião é maior neste estágio que nos anteriores. Além disso, devido à proximidade da eclosão, o córion se torna mais frágil e enrugado.

Dentro do cefalotórax encontra-se o sistema nervoso central, parte do trato intestinal, um par de glândulas de veneno e uma extensa musculatura nas extremidades, a faringe e estômago. Uma característica especial é o estreito esôfago que atravessa o sistema nervoso central horizontalmente, dividindo-o em gânglio supraesofágico e subesofágico (FOELIX, 1996). Próximo a região da faringe encontramos dois grupos musculares (músculo depressor da faringe e músculo elevador da faringe) (Fig. 22). Isso corrobora nossa sugestão de que as células do tipo II encontradas no cefalotórax da pré-larva sejam células precursoras dos miócitos.

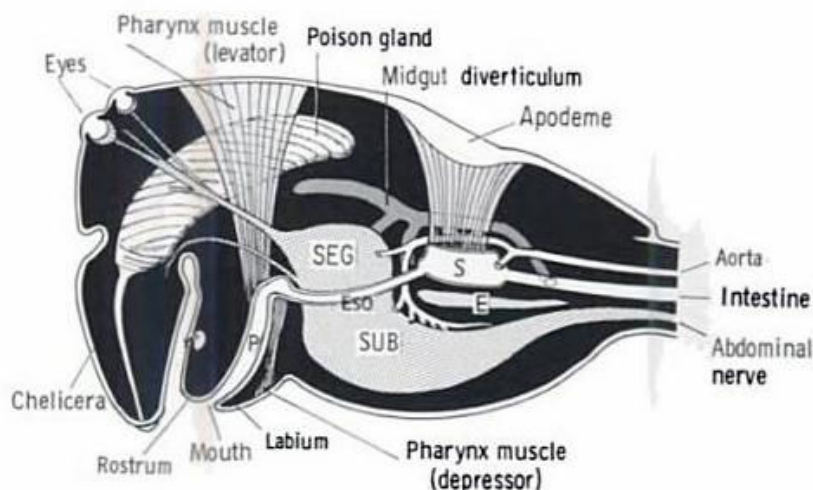


Figura 22. Esquema mostrando Secção longitudinal do prossoma de aranhas. E: endosternite; Eso: esôfago; P: faringe; SEG: gânglio supraesofágico; S: estômago; SUB: gânglio subesofágico. (Fonte: Foelix, 1996).

O desenvolvimento da base do sistema nervoso é semelhante em todas as aranhas. O cordão nervoso ventral se desenvolve a partir da ectoderme ventro lateral do embrião, e espessa bilateralmente para formar um par de gânglios rudimentares. A neurogênese começa com a invaginação proliferativa de células de diversos pontos germinais na ectoderme. Pelo menos a morfologia básica do cérebro em aranhas parece ser extraordinariamente conservada (BREIDBACH E KUTSCH, 1995). Anderson (1973) relata que existem detalhes em comum na formação do cérebro em aranhas e opiliões. O cérebro rudimentar da *Tarantula marginemaculata* consiste em de uma massa protocerebral, duas glândulas quelicerais que são consideradas como tritocérebro, e as vesículas laterais as quais formam a massa óptica lateral (Fig. 23).

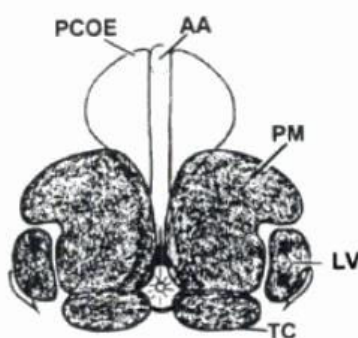


Figura 23. Esquema do cérebro rudimentar da *Tarantula marginemaculata*. AA: aorta anterior; LV: vesículas laterais; PCOE: celoma pré- queliceral; PM: massa protocerebral; TC: tritocérebro. (Fonte: Breidbach & Kutsch, 1995).

O formato em “H” do cérebro rudimentar encontrado em *Tarantula marginemaculata* (BREIDBACH E KUTSCH,1995) condiz com o formato do agrupamento de células encontrada no cefalotórax da pré-larva de *L. intermedia*,

que, no presente estudo, sugere-se se tratar de células precursoras do sistema nervoso central da aranha.

A pré-larva de *L. intermedia* ainda não possui todos os órgãos e sistemas completamente formados, e ainda possui grande quantidade de vitelo no interior do seu corpo, principalmente na região do abdome, indicando que sua alimentação continua sendo endógena. Entre os grânulos de vitelo e as células que irão formar as estruturas da aranha, encontram-se células gigantes, que acredita-se se tratar de vitelócitos. Esta localização sugere que essas células gigantes devem intermediar a captação de vitelo para as demais células.

2.4.2.10 Estágio 10: Eclosão (30 dpo)

A eclosão marca a transição entre o período embrionário e a vida pós-embrionária. Assim como em *L. intermedia*, a maioria das aranhas eclode na fase de pré-larva, porém em algumas espécies o embrião passa para a fase de larva antes de eclodir (HOLM, 1940).

Após a eclosão a maioria dos sistemas do corpo da aranha estão sendo formados. O sistema nervoso, órgão sensoriais, órgãos respiratórios, glândulas de veneno, glândulas da seda se originam a partir da ectoderme. A mesoderme se diferencia em musculatura, vasos sanguíneos, glândulas coxais e órgãos reprodutivos. E a endoderme forma os túbulos de Malpighi (FOELIX, 1996).

Comparando com outras espécies de aranhas observamos que o desenvolvimento embrionário da *L. intermedia* é mais demorado, sendo assim, é possível especular que o seu desenvolvimento lento esteja relacionado aos cuidados com a prole apresentado por esta espécie.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. **Embryology and phylogeny in annelids and arthropods**. New York: Pergamon. 495 p. 1973

AKIYAMA-ODA, Y.; ODA, H. Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. **Development** . v.130, p.1735–1747, 2003.

AKIYAMA-ODA, Y.; ODA, H. Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning. **Development**, v.133, p.2347-2357, 2006.

AKIYAMA-ODA, Y.; ODA, H. Differing strategies for forming the arthropod body plan: Lessons from Dpp, Sog and Delta in the fly *Drosophila* and spider *Achaeearanea*. **Develop. Growth Differ.**, v.50, p. 203-214, 2008.

BREIDBACH, O.; KUTSCH, W. **The nervous systems of invertebrate: an evolutionary and comparative approach**. Ed. Birkhäuser Verlag, Alemanha, 1995.

BRESSAN, C.M.; MÜLLER, Y.M.R. Characterization of Embryonized Naupilus Development of *Macrobrachium acanthurus* (Crustácea, Decápoda). **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 14, n.2, 243-246, 1997.

CHAW, R. C.; VANCE, E.; BLACK, S. D. Gastrulation in the Spider *Zygiella x-notata* involves Three Distinct Phases of Cell Internalization. **Dev. Dynamics**, v. 236, p.3484-3495, 2007.

CHEN, J.Y., WALOSZEK, D., MAAS, A. A new “great appendage” arthropod from the Lower Cambrian of China and the Phylogeny of Chelicerata. **Lethaia**. v. 37, p.3–20, 2004.

FLEIG, R.; SANDER, K. Blastoderm development in honey bee embryogenesis as seen in the scanning electron microscope. **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**. v.8, p. 279-286, 1985.

FOELIX, R.F. **Biology of Spiders**. 2ª Ed. New York Harvard. V. Press, Cambridge, 1996.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.** v.304, p.261-267, 1992.

GARCIA, S.M.; GARCÍA FERNEANDEZ, C. **Biologia do Desenvolvimento**. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

GERRITY, R.G.; REMPEL, J.G.; SWEENEY, R.P. The embryology of *Lytta viridana* Le conte (Coleoptera: Meloidae), the structure of the vitelline membrane. **Cam. J. Zool.** v.45, p. 497-509, 1987.

GILBERT, F.S. **Developmental Biology**, editora Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A., 2006.

HOLM, A. Studien über die Entwicklung und Entwicklungsbiologie der Spinnen. **Zool. BiDr Uppsala** v.19, p.1-214, 1940.

HOLM, A. Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung und entwicklungsphysiologie des Spinnenembryos. **Zoll. Bidrag. Uppsala.** v. 29, p. 293-424, 1952.

HOLM, A. Notes on the development of an orthognath spider, *Ischnothele karschi* Bos. & Lenz. **Zool Bidr Uppsala.** v. 30, p.199–221, 1954.

HUMPHREYS, F.W. The surface of spiders eggs. **J. Zool. London**, v.200, p.303-316, 1983.

ITOW, T., KENMOCHI, S.; MOCHIZUKI, T. Induction of secondary embryos by intra- and interspecific grafts of center cells under the blastopore in horseshoe crabs. **Dev. Growth Differ.** v. 33, p.251–258, 1991.

LAMBERT, A.E. History of the procephalic lobes of *Epeira cinerea*. A study in arachnid embryology. **J. Morphol.** v. 20, n.03, p.413-461, 1909.

MACHIDA, R.; NAGASHIMA, T.; ANDO, T. The early embrionic development of the jumping bristletail *Pedetontus unimaculatus* Machida (Hexapoda: Microcorryphia, Machilidae), **J. Morphol.** v. 206, p.181-195, 1990.

MCGREGOR, A.P.; PECHMANN, M.; SCHWAGER, E.E.; FEITOSA, N.M.; KRUCK, S.; ARANDA, M.; DAMEN, W.G.M. Wnt8 Is Required for Growth-Zone Establishment and Development of Opisthosomal Segments in a Spider. **Current Biology** v.18, p. 1619–1623, 2008.

MCGREGOR, A.P.; PECHMANN, M., SCHWAGER, E. E.; DAMEN, W.G.M. An ancestral regulatory network for posterior development in arthropods. **Communicative & Integrative Biology.** v. 2, p. 1-3, 2009.

MÜLLER, R.M.I. The embryonic development of *Macrobrachium carcinus*. **Zool. Jb. Anat.** v. 112, p. 51-78, 1984.

MONTGOMERY JUNIOR, T.H. The developmental of theridium, an aranead, up to the stage of reversion. **J. Morphol.** v. 20, n. 02, p. 298-351, 1909.

PASCUCCI, T.; PERRINO, J.; MAHOWALD, P.A.; WARING, L.G. Eggshell assembly in *Drosophila*: Processing and localization of membrane and chorion proteins. **Developmental Biology.** v.177, p.590-598, 1996.

REMPEL, J. C. The embryology of *Lytta viridana* Le conte (Coleoptera:Meloidae). Maturation, fertilization, and cleavage. **Can. J. Zool.** v.43, p.915-925, 1965.

REMPEL, J. C. The embriology of black widow spider. *Latrodectus mectans*. **Can. J. Zool.**, v. 35, p. 35-57, 1957.

SCHOPPMEIER, M., DAMEN, W.G.M. Suppressor of Hairless and Prenesilin phenotypes imply involvement of canonical Notch-signalling in segmentation of the spider *Cupiennius salei*. **Developmental Biology.** v. 280, p.211–224, 2005.

- SEITZ, V. K. A. Embryonale defekt- und doppelbildungen im ei der spinne *Cupiennius salei* (Ctenidae). **Zool. Jb. Anat. Bd.** v.87, p.588–639, 1970.
- SEKIGUCHI, K. Reduplication in spider eggs produced by centrifugation. **Sci. Report Tokyo Kyoiku Daigaku, Sec. B.** v.8, p. 227–280, 1957.
- SEKIGUCHI, K. Experimental embryology: effects of electrocauterization. In **Biology of Horseshoe Crabs, Revised Edition**. Ed. K. Sekiguchi, pp. 178–191. Seisaku Douzin, Tokyo, 1999.
- SUZUKI, H. Fertilization occurs internally in the spider *Achaearanea tepidariorum* (C. Koch). **Inv. Reprod. Dev.** v.28, n. 03, p.211-214, 1995.
- SUZUKI, H; KONDO, A. Early embryonic development, including germ-disk stage, in the Theridiid spider *Achaearanea tepidariorum*. **J. Morphol.** v. 224, p. 147-157, 1994.
- STOLLEWERLK, A.; SEYFARTH, E. A. Evolutionary changes in sensory precursor formation in arthropods: Embryonic development of leg sensilla in the spider *Cupiennius salei*. **Developmental Biology.** v.313, n. 2, p. 659-673, 2008.
- SWEENY, R.P.; CHURCH, S.N.; REMPEL, G.J; GERRITY, G.R. The embryology of *Lytta viridiana* Le conte (Coleoptera: Meloidae). The structure of the chorion e micropyles. **Can. J. Zool.** v. 46, p.213-217, 1967.
- TAKESUE, S.; KEINO, H.; ONITAKE, K. Blastoderm formation in the silkworm egg (*Bombyx mori* L.), **J. Embryol. Exp. Morph.** v.69, p. 117-125, 1980.
- TOJO, K.; MACHIDA. R. Early embryonic development of the mayfly *Ephemera japonica* McLachlan (Insecta: Ephemeroptera, Ephemeridae) **Journal of Morphology.** v.238, p. 327-335, 1998.
- TURNER, F. R.; MAHOWALD, A. P. Scanning Electron Microscopy of *Drosophila* embryogenesis. **Developmental Biology.** v. 50, p. 95-108, 1976.
- VANCHON, M. Contribution à létude du développement postembryonnaire des araignées. Première note. Généralités et nomenclature des stades. **Bull. Soc. Zool.** v.82, p.337, 1957.
- VISCUSO, R.; LONGO, G.; SOTTILE, L. Proposal for new termo f definition for the so called “extrachorion” of the eggs of the orthoptera acrididae based on a study of its origin. **Arch. Biol. (Bruxelles).** v. 95, p. 493-500, 1984.
- WOLF, R. The cyaster, a colchicine-sansitive migration organelle of cleavage nuclei in an insect egg. **Dev. Biol.** v. 62, p. 464-472, 1976.
- YOSHIKURA, M. Notes on the development of trap-door spider *Ummidia fragaria* (Doenitz). **Acta Arachnol.** v. 24, n.01, p. 29, 1972.

Capítulo III – MÉTODOS PARA OBTENÇÃO, MANIPULAÇÃO E PREPARO DE EMBRIÕES DE ARANHAS²

² O conteúdo deste capítulo é parte integrante do capítulo de livro: Ortolani-Machado, C.F., Rios, F.S.; Freitas, P.F., Okada, M.A., Rodrigues-Galdino, A.M., Maiolino, C.V., Tamada, M.H. Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. In: C.A. Oliveira-Ribeiro; S.R. Grotzner & H. S. dos Reis-Filho (Eds.) Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan (*in press*).

3.1. IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DOS EMBRIÕES DE ARANHA

Apesar da ampla distribuição das aranhas, que são encontradas em quase todos os ambientes da Terra, estudos voltados para a embriologia e biologia do desenvolvimento de aranhas são escassos. Baseadas neste fato, técnicas voltadas para o estudo do desenvolvimento embrionário de aranhas são de grande importância, pois resultados obtidos através destas técnicas podem gerar, além de fornecimento de conhecimento básico, dados que possibilitem medidas de controle populacional de algumas espécies desde o período embrionário.

Nesta seção, trataremos apenas de técnicas direcionadas ao período embrionário, apesar da ontogenia da aranha ser dividida também nos períodos larval e ninfo-imaginário. O período embrionário engloba desde o momento que o ovo é fertilizado até que a forma típica do corpo da aranha seja estabelecida. .

Todos os procedimentos referentes ao embrião ou adulto de aranha neste capítulo estão relacionados ao gênero *Loxosceles*, que representa hoje um sério problema de saúde pública para o Estado do Paraná. Porém, as informações contidas nesta seção poderão possivelmente ser utilizadas para outros gêneros e espécies, apesar da variação entre eles.

3.2. OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES DE ARANHA

3.2.1. Manutenção dos Animais Adultos em Laboratório

Para a obtenção de embriões em laboratório, é necessária a manutenção de casais de adultos para indução da cópula e observação do momento da postura. Para isto, deve-se:

- Acondicionar as aranhas adultas em frascos plásticos (de pelo menos 150 ml), com pequenos furos na tampa para permitir a passagem de ar.
- Mantê-las ao abrigo de luz direta (devido ao fato de habitarem locais escuros), podendo ser guardadas dentro de caixas (Fig. 24A) ou armários. Lembrar sempre de deixar passagens para ventilação.
- Alimentar as aranhas quinzenalmente com insetos ou outros artrópodos pequenos (um indivíduo por aranha). Mesmo que haja alimento disponível, raramente as aranhas se alimentam em intervalos de tempo menores que 15 dias. Em laboratório, frequentemente se utiliza larvas de *Tenebrio molitor*

(Insecta: Coleoptera), devido a sua facilidade de manutenção. Juntamente com o alimento deve ser colocado algodão embebido em água para manter a umidade adequada (Fig. 24B).

- Os tenébrios podem ser mantidos em recipientes de vidro ou plástico (Fig. 24C e D), ventilados e ao abrigo da luz direta, contendo pedaços de pão e farelo de trigo ou aveia para sua alimentação. Não deve ser oferecido água a estas larvas.
- É importante ressaltar que para o manuseio das aranhas é imprescindível o uso de luvas.

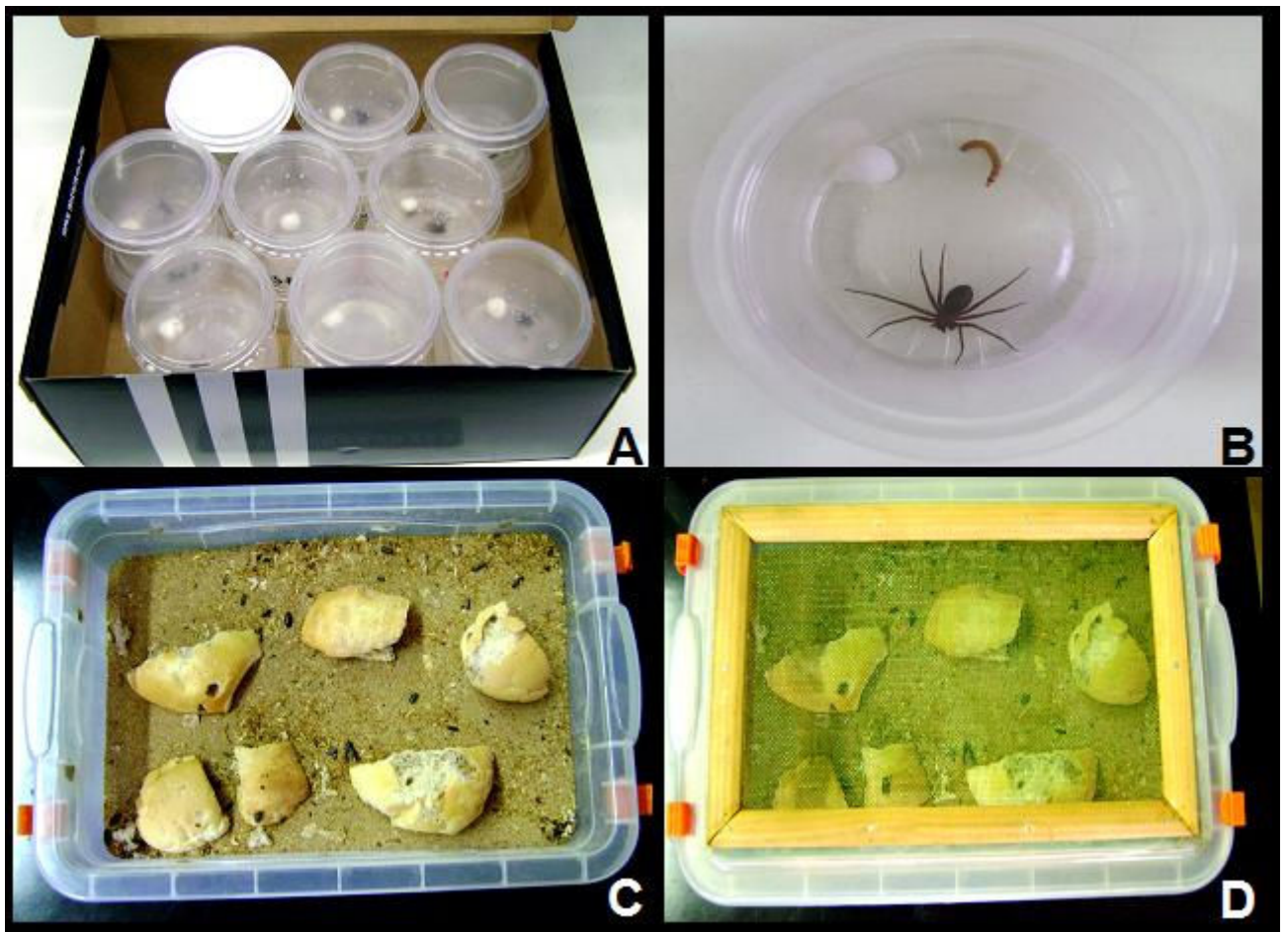


Figura 24. (A) Caixa contendo recipientes nos quais as aranhas adultas são individualmente acondicionadas. (B) Recipiente de manutenção, contendo um indivíduo adulto da espécie *Loxosceles intermedia*, uma larva de *Tenebrio molitor* utilizada como alimento e um pedaço de algodão umedecido. (C) e (D) Caixa de manutenção dos tenébrios (aberta e fechada, respectivamente), contendo pedaços de pão e aveia em flocos.

3.2.2. Identificação da Fêmea e do Macho Adultos

Para que sejam formados casais para a realização da cópula, é necessária a identificação do macho e da fêmea. Estes apresentam dimorfismo sexual, sendo que

a diferenciação pode ser visualizada externamente. Os machos apresentam um abdome menor e mais alongado e possuem as pernas relativamente mais longas do que as fêmeas (Fig. 25A). Outra característica muito importante é a diferença encontrada no par de pedipalpos, sendo que nos machos estas estruturas são maiores e apresentam um bulbo copulatório na extremidade (Fig. 25A), dentro dos quais são estocados os espermatozóides. Já os pedipalpos da fêmea são menores e não apresentam o referido bulbo copulatório (Fig. 25B).

É importante salientar que os animais só realizarão a cópula quando tiverem atingido sua maturidade sexual, o que acontece após a 7ª muda. Dá-se o nome de muda ou ecdise à mudança do exoesqueleto nos animais que apresentam este modo de crescimento.

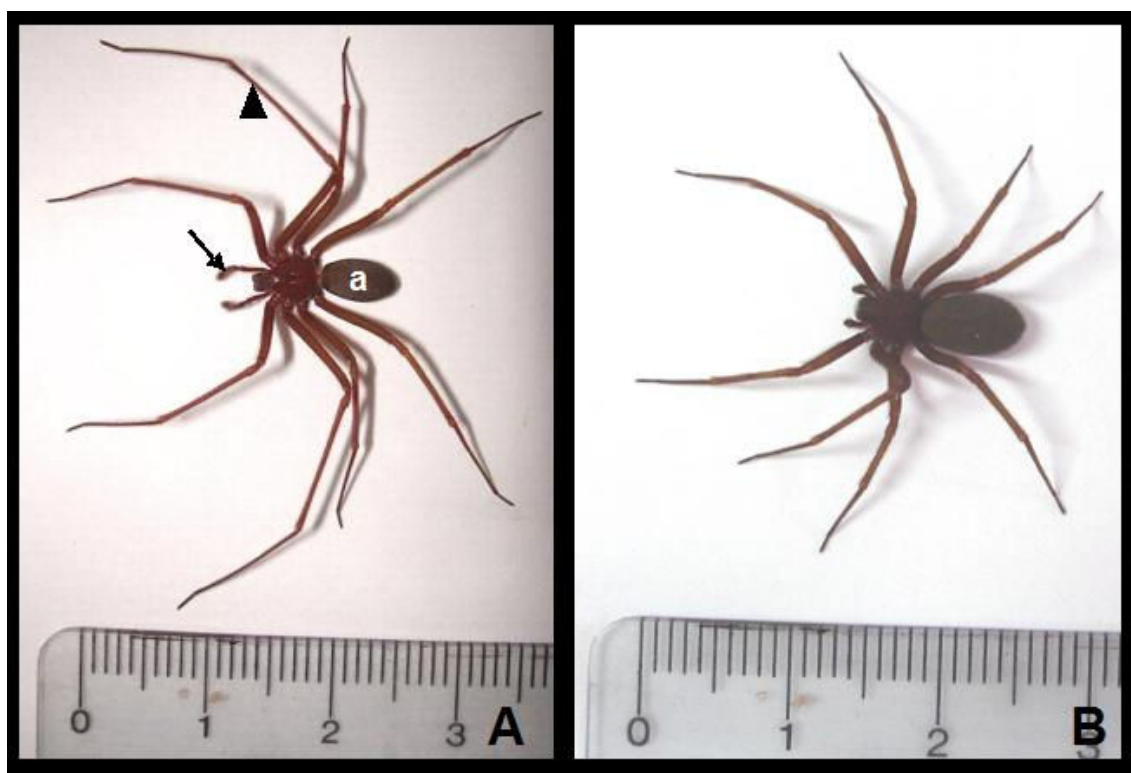


Figura 25. Exemplos adultos de *Loxosceles intermedia*. **(A)** Macho e **(B)** fêmea. No macho, são destacados a presença de pedipalpos (seta) e pernas (cabeça de seta) maiores, além de abdome (a) menor e mais alongado, que na fêmea.

3.2.3. Cópula

Para a realização da cópula, o casal deve ser colocado em recipiente de vidro de aproximadamente 2000 ml, sempre respeitando a relação de uma fêmea para cada macho. A escolha dos animais pode ser feita de maneira aleatória, porém,

deve-se considerar como parâmetro comparativo o tamanho dos indivíduos, os quais devem ter aproximadamente do mesmo tamanho.

Etapas do comportamento copulatório:

- A.** Reconhecimento: o macho procura pela fêmea movimentando os dois pares de pernas anteriores para frente e para trás. Esses movimentos são lentos e resultam no encontro do macho com a fêmea (Fig. 26A).
- B.** Movimento dos pedipalpos: as fêmeas executam movimentos ascendentes e descendentes de pedipalpos durante o encontro com o macho. Se o macho estiver receptivo também irá movimentar seus pedipalpos (Fig. 26B).
- C.** Movimento do abdome: após o contato com o macho, a fêmea realiza movimentos ascendentes e descendentes com seu abdome (Fig. 26B).
- D.** Toque dos pedipalpos: quando o casal está apto para a cópula, eles se posicionam um diante do outro, com o macho dispondo seus pedipalpos de maneira que as extremidades dos pedipalpos da fêmea toquem seus bulbos copulatórios (Fig. 26C).
- E.** Introdução do pedipalpo: tendo havido aceitação de ambas as partes, o macho induz a elevação do cefalotórax da fêmea e introduz o seu bulbo copulatório na fenda genital da fêmea (Fig. 26D).
- F.** Retirada dos pedipalpos: após a cópula, o macho retira seus pedipalpos da fenda genital da fêmea e cada um vai para um lado (Fig. 26E).

Após o término da cópula é importante separar o casal, pois se não houver receptividade de um dos animais para uma segunda cópula, eles acabam entrando em conflito, podendo resultar na morte de um dos indivíduos.

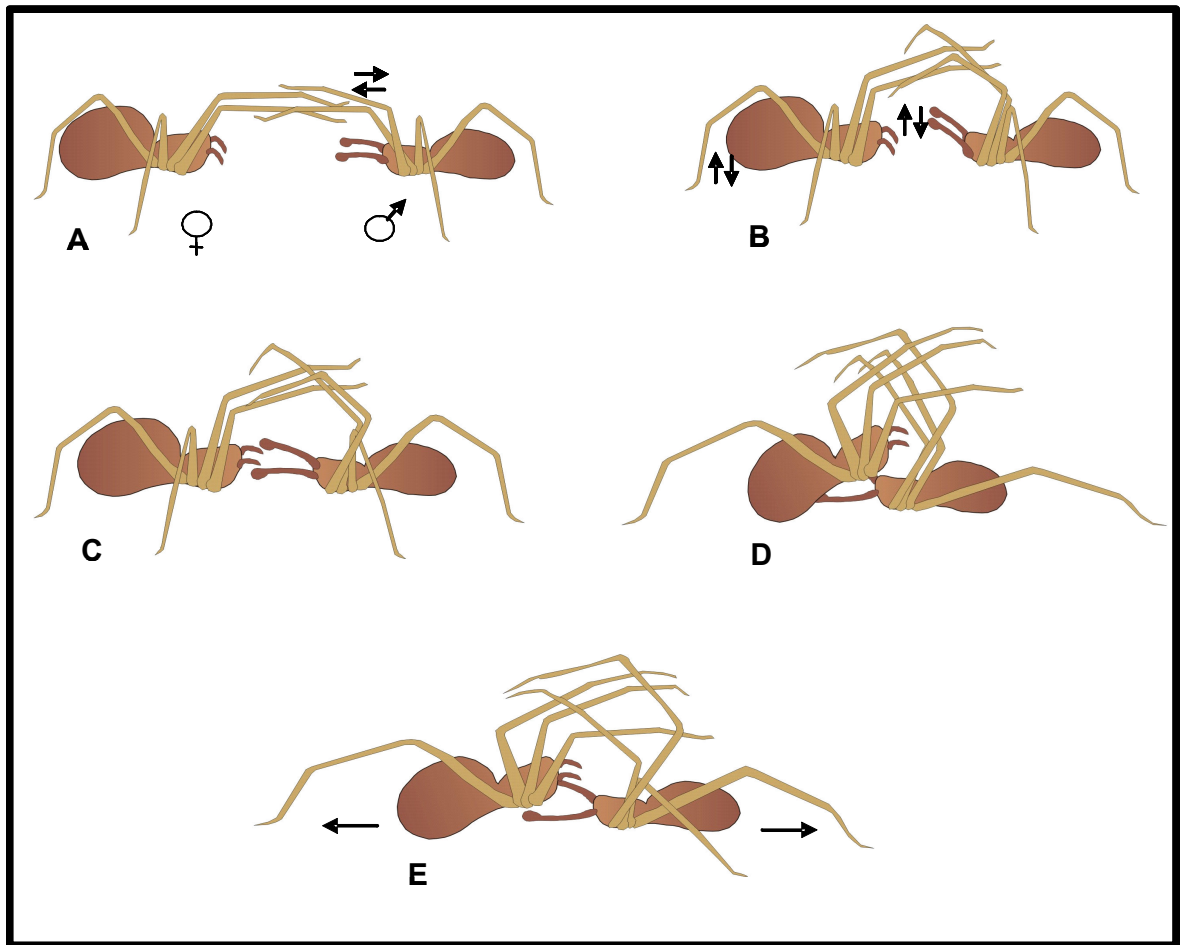


Figura 26. Figura esquemática das etapas do comportamento copulatório de *Loxosceles intermedia*. (A) Reconhecimento. (B) Movimento dos pedipalpos e abdome. (C) Toque dos pedipalpos. (D) Introdução do pedipalpo do macho na abertura genital da fêmea. (E) Retirada dos pedipalpos.

3.2.4. Oviposição

Em geral, a oviposição não ocorre imediatamente após a cópula, podendo acontecer até meses depois. Isto é possível devido à capacidade da fêmea em armazenar os espermatozóides viáveis no interior de suas espermatecas por longos períodos de tempo. Além disto, devido a esta estocagem de espermatozóides, a fêmea pode colocar ovos mais de uma vez dentro de um intervalo de alguns meses com a realização de apenas uma cópula. Assim sendo, muitas vezes, obtém-se ovos a partir de fêmeas coletadas, sem que tenha sido induzida cópula em laboratório, ou seja, a partir de cópula realizada previamente no próprio ambiente.

A construção de ootecas, cuja forma se adapta às condições do substrato, tem como função a reunião dos ovos e, conseqüentemente, sua proteção contra

predadores e intempéries. Momentos antes da postura, a fêmea inicia a construção da ooteca, que segue a seguinte ordem:

- A. Inicialmente ocorre a confecção da parte inferior, que é formado por fios de seda finos, presos ao substrato. A fêmea movimenta-se em círculo, direcionando o abdome da periferia ao centro, unindo pontos radiais.
- B. Depois de pronto, a fêmea posiciona-se sobre a parte inferior e inicia a desova.
- C. Após o término da postura, começa a construção da parte superior da ooteca.
- D. Terminada a construção, a fêmea fica em repouso, posicionando-se sobre a ooteca durante todo o período de desenvolvimento embrionário (Fig. 27A).

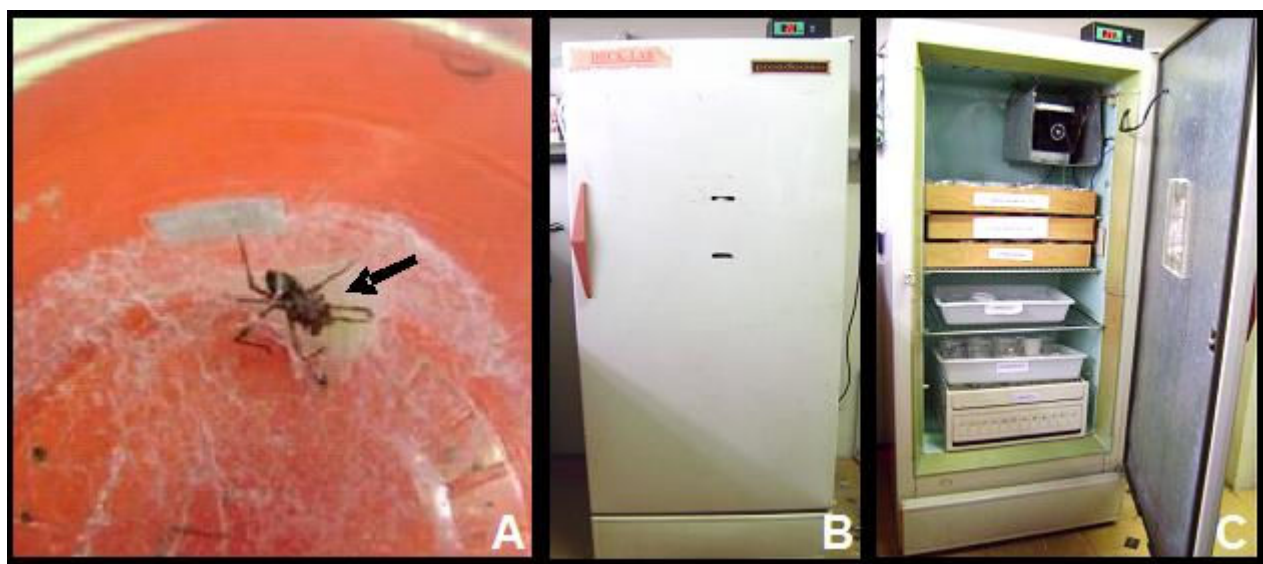


Figura 27. (A) Fêmea de *Loxosceles intermedia* posicionada sobre sua ooteca (seta). **(B)** e **(C)** Estufa (adaptada a partir de uma geladeira) utilizada para manter as aranhas em temperatura constante ($28 \pm 1^\circ\text{C}$).

A temperatura é um dos fatores que influencia a oviposição e por isto as fêmeas copuladas são mantidas em uma estufa com temperatura constante de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 27B e C). Nesta temperatura, verificou-se que o tempo entre uma oviposição e outra é menor. A verificação da temperatura deve ser diária.

3.2.5. Coleta dos Ovos

Diariamente, as fêmeas são observadas. Verificando-se a presença de ootecas, os ovos são coletados conforme se segue:

- A. Transferir a fêmea para um recipiente separado de sua prole. Isto é necessário pois uma vez manipulada a ooteca, a fêmea tende a comer os ovos.
- B. Isolar a ooteca com a ajuda de uma pinça de ponta fina e uma tesoura oftalmológica e transferi-la para uma placa de Petri.
- C. Fazer uma pequena incisão na parte superior da ooteca (Figura 28A), através da qual os ovos serão retirados.
- D. Remover os ovos da ooteca com auxílio de um pincel de ponta fina, fazendo movimentos leves para que cada ovo role para fora da ooteca (Figura 28B). Uma vez que os ovos são muito frágeis, qualquer movimento mais brusco pode torná-lo inviável.

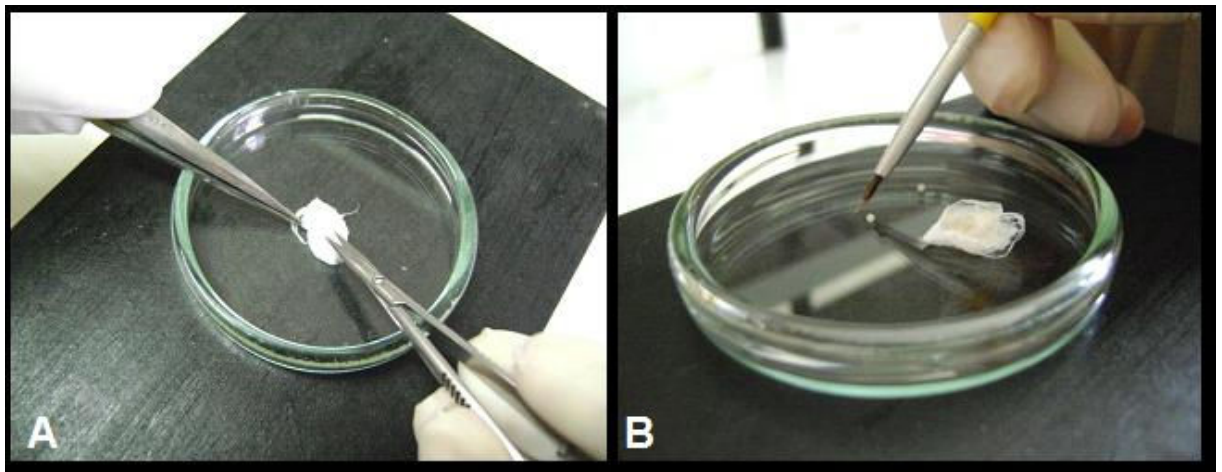


Figura 28. Coleta dos ovos de uma ooteca de *Loxosceles intermedia*. (A) Incisão na parte superior da ooteca. (B) Retirada dos ovos com auxílio de um pincel.

3.3. ANÁLISE DOS EMBRIÕES INTACTOS E EM MONTAGENS TOTAIS

3.3.1. Utilização do Óleo de Parafina para Observação de Embriões Vivos

Um dos procedimentos utilizados no estudo do desenvolvimento embrionário de aranhas é mergulhar o ovo em uma fina camada de óleo de parafina (óleo mineral). Isto fará com que o córion se torne transparente, sem interferir na sobrevivência e desenvolvimento normal do embrião. Deste modo, é possível acompanhar em um mesmo embrião o desenvolvimento da morfologia externa, desde a oviposição até a eclosão.

Com o uso de uma máquina fotográfica acoplada à ocular do microscópio estereoscópico é possível capturar imagens das diferentes fases do desenvolvimento embrionário, como demonstrado na Fig. 29.

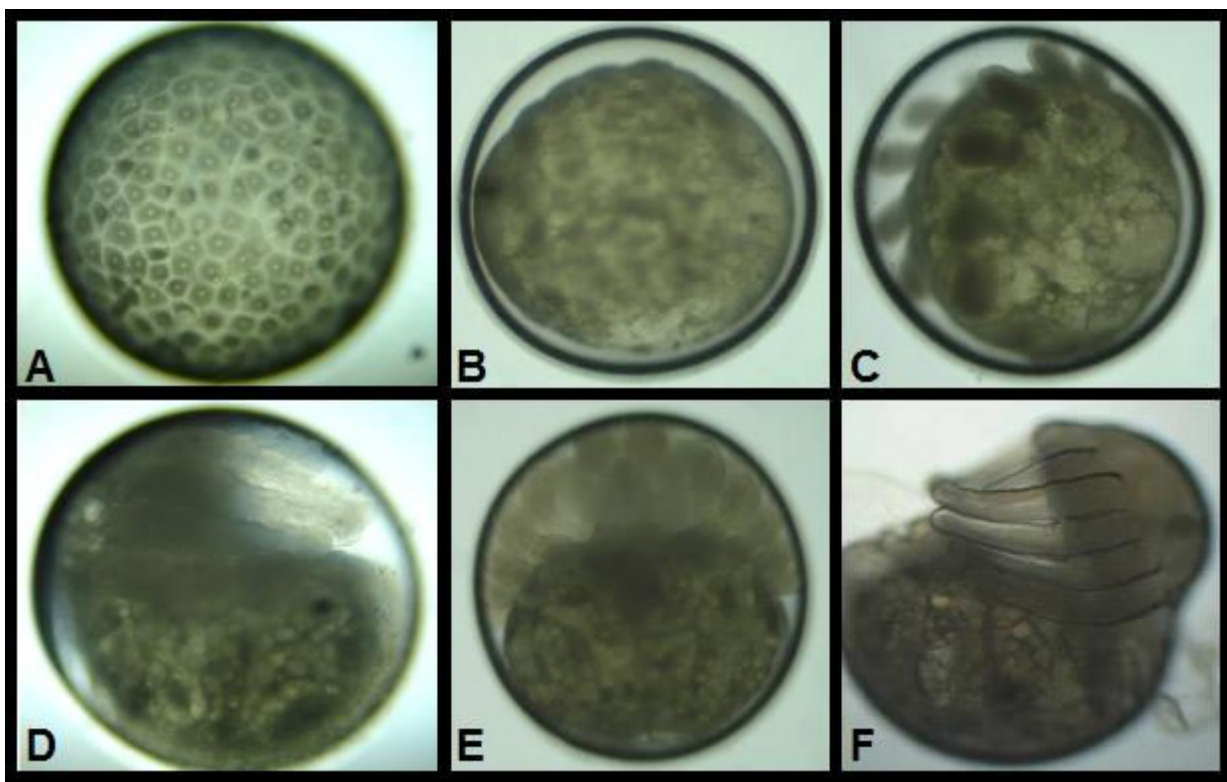


Figura 29. Embriões vivos de *Loxosceles intermedia* em parafina líquida. **(A)** 3 dias após a oviposição (dpo); **(B)** 14 dpo; **(C)** 16 dpo; **(D)** 23 dpo; **(E)** 26 dpo; **(F)** 30 dpo (eclosão). Com exceção deste último, os embriões se encontram envoltos pelo córion.

3.3.2. Montagem Total dos Embriões

Outro método interessante para se estudar o desenvolvimento embrionário das aranhas é fazer a montagem total de embriões fixados e corados. Ao contrário do método descrito anteriormente (observação em óleo de parafina), este método preserva o embrião inteiro em uma determinada fase do desenvolvimento. A montagem total pode ser realizada em resina (Bálsamo do Canadá ou Permout) sobre lâmina escavada onde os ovos ficam localizados entre lâmina e lamínula. Porém, para se ter uma visualização de todos os lados do embrião é interessante incluir os ovos, dentro de um capilar de vidro ao invés de lâmina histológica.

Este método foi adaptado a partir da montagem total de ovos de abelha (BEIG &. BUENO, 1987), tendo se mostrado adequado ao estudo de embriões de aranha. Uma vez que é possível girar o capilar sobre uma lâmina, como mostrado adiante, tem-se a possibilidade de analisar os embriões em diferentes posições.

Passos para a montagem total:

- A.** Fixar os embriões em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por 3 horas, a temperatura ambiente.
- B.** Lavar os embriões em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, duas vezes, 10 minutos cada.
- C.** Lavar em água destilada, 3 vezes, rapidamente.
- D.** Corar os embriões com vermelho neutro 1% ou azul de metileno 1%, por 24 horas. Nesta etapa o embrião está envolvido pelo córion, que dificulta a penetração do corante, sendo necessário este tempo prolongado de coloração. É importante lembrar de filtrar o corante antes de usá-lo.
- E.** Desidratar os embriões em série crescente de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I e 100% II), 10 minutos em cada banho.
- F.** Diafanizar com xilol I e II, 10 minutos cada.
- G.** A partir deste ponto pode-se montar os embriões em lâmina de vidro escavada ou em capilar de vidro. Para montagem dos embriões em capilar de vidro, proceder como se segue:
 - Com o auxílio da extremidade mais larga de uma pipeta Pasteur, colocar os embriões sobre um vidro relógio contendo xilol.
 - Retirar o excesso do xilol e adicionar a resina (Permount) (Fig. 30A).
 - Aspirar, cuidadosamente, o embrião com o capilar de vidro (Fig. 30B). Se a resina de montagem começar a endurecer, adicionar uma pequena quantidade de xilol.
 - Repousar o capilar em um suporte plano (Fig. 30C-D) até que a resina endureça completamente; isto evitará que os embriões se movimentem. Pode demorar vários dias para a secagem completa. Nesta fase, lembrar de colocar uma etiqueta para identificar cada capilar (Fig. 30D).
 - Então, colar fita dupla face nas duas extremidades de uma lâmina histológica e colocar o capilar sobre ela (Fig. 30E). Desta forma, durante a observação do embrião é possível girar o capilar sobre a lâmina, obtendo, assim, uma imagem completa (Fig. 30F-G). Tomar cuidado para não dispor os embriões muito próximos uns dos outros pois isto dificultará a observação total do mesmo (Fig. 30H).

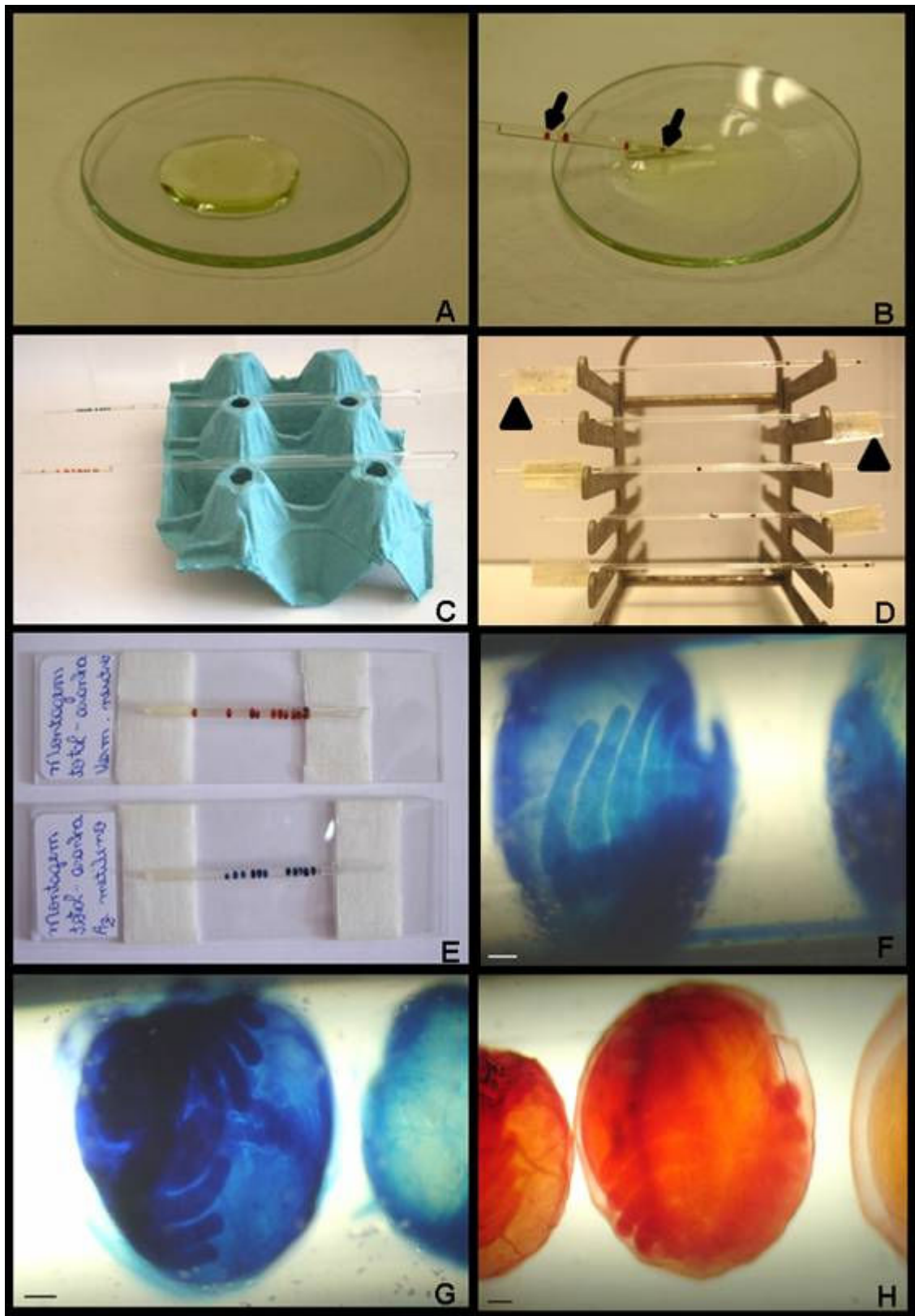


Figura 30. Processo de montagem total do embrião de *Loxosceles intermedia* em capilar de vidro. **(A)** Vidro relógio contendo resina Permout. **(B)** Embriões corados com vermelho neutro (setas) sendo aspirados pelo capilar de vidro. **(C-D)** Secagem da resina em superfície plana. **(E)** Capilar aderido à lâmina com fita dupla face. **(F)** Embrião corado com azul de metileno em vista lateral e **(G)** ventral. **(H)** Embrião corado com vermelho neutro em vista dorsal. Cabeça de seta: Etiquetas de identificação do material no capilar de vidro durante a secagem. Escala: 100 μ m.

3.4 RETIRADA DOS ENVOLTÓRIOS DOS OVOS

Dependendo do objetivo do estudo, pode haver necessidade de se retirar os envoltórios (córion e membrana vitelínica) dos ovos de aranha, como, por exemplo, para uma melhor e mais rápida penetração do fixador ou do meio de inclusão, ou para observação do embrião ao microscópio eletrônico de varredura.

Existem dois métodos para a retirada dos envoltórios, a técnica I é mais apropriada para quando os embriões estão em um estágio mais avançado de desenvolvimento (ex. pré-larva). Já a técnica II é realizada para embriões em estádios mais novos.

3.4.1 Técnica I

- Retirada do córion:

- Lavar os embriões em solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) 50%, três banhos de 5 minutos cada, sob agitação constante.
- Observar ao microscópio estereoscópico até que os ovos fiquem totalmente descorionizados.
- Lavar com água destilada, 3 vezes, rapidamente.

- Retirada da Membrana Vitelínica:

- A. Após a retirada do córion, colocar os ovos em heptano (100%) acrescido do fixador paraformaldeído (PFA) 4% (1:1), sob agitação constante, durante 20 minutos. Haverá separação da solução em duas fases, sendo a superior orgânica (heptano) e a inferior aquosa (fixador). Inicialmente, os ovos ficarão na superfície da fase superior (Fig. 31A).
- B. A separação da membrana vitelínica pode ser observada visualmente. Ao perceber tal separação, adicionar metanol 100% no mesmo volume de fixador e heptano da solução anterior, ficando numa proporção 1:1:1 (fixador : metanol : heptano). Manter a solução sob agitação constante. O metanol irá se misturar ao fixador, permanecendo na fase inferior da solução (Fig. 31B).
- C. À medida que os embriões forem perdendo sua membrana vitelínica irão para o fundo do frasco (Fig. 31B). As membranas desprendidas, bem como alguns embriões que não perderam a membrana vitelínica permanecem na fase superior (heptano).

- D. Os embriões depositados no fundo devem ser lavados três vezes em metanol e nele mantidos sob refrigeração até o processamento final.
- E. É importante ressaltar que para a realização deste protocolo deve-se utilizar recipiente de vidro, uma vez que o heptano corrói o plástico.

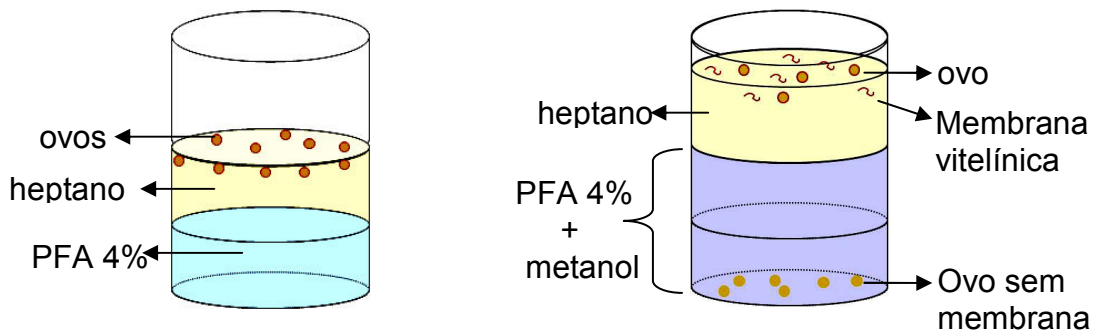


Figura 31. Processo para retirada da membrana vitelínica dos ovos. **(A)** Primeira etapa da retirada da membrana: solução de heptano e fixador. **(B)** Após adição de metanol à solução, ovos perdem as membranas vitelínicas e se depositam no fundo.

3.4.2 Técnica II

- Fixar os embriões em Carnoy (ácido acético: clorofórmio: álcool 100% na proporção 1:3:6) por 30 minutos. Nesta fase o córion de alguns embriões já se rompem espontaneamente;
- Lavar os embriões em álcool 90% duas vezes, 10 minutos cada;
- Transferi-los para uma solução de tampão fosfato 0,1M pH7,4;
- Para retirar a membrana vitelínica, sob microscópio estereoscópico realizar no embrião movimentos suaves com o auxílio de alfinetes entomológicos;
- Manter os embriões em tampão fosfato 0,1M pH7,4 até posterior processamento.

3.5. UTILIZAÇÃO DA MICROSCOPIA DE LUZ PARA OBSERVAÇÃO DE EMBRIÕES FIXADOS

A preparação de embriões de aranha para microscopia de luz segue metodologias de rotina, sendo detalhados abaixo alguns procedimentos específicos para estes organismos.

3.5.1. Fixação

Na tabela abaixo são citados alguns fixadores que mostram ótimos resultados em embriões de aranha. O tempo de fixação normalmente é maior devido à presença do córion e membrana vitelínica.

Tabela 3.1. Fixadores que apresentam excelentes resultados para embriões de aranha (*Loxosceles intermedia*).

Fixador	Tempo de fixação	Lavagens
Paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4	3 h a 25°C ou 4 h a 4°C	2 banhos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, 10 minutos cada.
Paraformaldeído 4% em PBS 0,1M pH 7,4	3 h a 25°C ou 4 h a 4°C	2 banhos em PBS 0,1M, pH 7,4, 10 minutos cada.
Fluido de Bouin	24 h a 25°C	Em água corrente, durante a noite.
ALFAC	16 h a 25°C	-----

3.5.2. Inclusão

O melhor resultado para a observação dos embriões à microscopia de luz ocorre com a inclusão dos mesmos em historesina, conforme descrito a seguir.

- A. Desidratação: Para a inclusão em historesina JB4® (Polysciences®) é necessário que os embriões sejam desidratados em série crescente de etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% I e 100% II), 10 minutos cada banho.
- B. Infiltração: Após passar pelo último banho de álcool 100%, colocar os embriões em uma solução de pré-infiltração (solução A + álcool 100%, 1:1), por 3 horas, a 4°C. Segue-se, então, para a solução de infiltração (solução A pura), por 2 semanas, a 4°C. Este passo da infiltração é extremamente importante; por isto nunca se deve deixar menos de 2 semanas na solução de infiltração para garantir adequada infiltração. O material estará completamente infiltrado pela historesina quando o espécime ficar com aspecto translúcido.
- C. Inclusão: O preparo da solução de inclusão e a emblocagem devem ser realizados a baixa temperatura, sobre almofada de gelo, para evitar a rápida polimerização da resina.

Preparo da solução de inclusão (historesina JB4®):

- A. Em recipiente plástico, com o auxílio de um palito de madeira, misturar bem as soluções A e B (23:1, vol:vol).
- B. Preencher os moldes com a solução de inclusão, tomando muito cuidado para não formar bolhas, e posicionar o material na orientação desejada.
- C. Para que ocorra a polimerização completa da resina o material deve ficar no vácuo por, no mínimo, 24 horas.

Obs: Esta solução após preparada não pode ser guardada. Sendo assim, deve-se preparar exatamente a quantidade necessária para preencher o número de moldes planejado. Por exemplo, para cada molde de 300 µl, utilizar 287,5 µl de Solução A e 12,5 µl Solução B.

3.5.3. Microtomia

Após a completa polimerização do bloco, segue-se o processo de microtomia para historesina.

- A. Identificação das lâminas: Antes do início dos cortes, identificar as lâminas com as informações que julgar necessárias, além do número da lâmina.
- B. Cortes: A microtomia é feita em micrótomo rotativo convencional, utilizando-se navalhas de aço especiais para historesina ou navalhas de tungstênio. A espessura dos cortes de material incluído em historesina varia entre 3 a 5µm. A análise das lâminas será facilitada se os cortes forem colocados sempre em uma mesma ordem, conforme esquematizado na Fig 32.
- C. Distensão: Para distender os cortes, colocar uma pequena gota de água destilada sobre a lâmina (não deve estar gelatinizada) e, com a ajuda de um pincel, distender o corte sobre a gota. Esta fase requer paciência pois algumas vezes os cortes acabam enrolando. Quando a lâmina estiver completa, colocá-la para secar sob placa aquecedora, tomando cuidado para não danificar o material.

IDENTIFICAÇÃO DA LÂMINA		IDENTIFICAÇÃO DA LÂMINA		IDENTIFICAÇÃO DA LÂMINA	
1	6	1	2	1	
2	7	3	4	2	
3	8	5	6	3	
4	9	7	8	4	
5	10	9	10	5	

Figura 32. Diferentes sugestões para orientação dos cortes na lâmina histológica.

3.5.4. Coloração

A coloração de cortes feitos em historesina varia em relação aos cortes em parafina, pois neste caso não há necessidade de passar pelos banhos de álcool e xilol, tornando a coloração muito mais rápida. A coloração mais utilizada para observação de embrião de aranha é a hematoxilina e eosina (Fig. 33), pois se tratando de uma coloração panocítica, a estrutura geral do material pode ser avaliada antes de se utilizar colorações mais específicas. O protocolo para coloração em hematoxilina e eosina é descrito abaixo:

- A. Deixar as lâminas em água destilada para hidratar por 5 minutos.
- B. Corar com hematoxilina de Harris, por 1 minuto*.
- C. Manter em água corrente por 10 minutos, para viragem.
- D. Corar com eosina, por 30 segundos*.
- E. Lavar em água destilada até que o excesso do corante tenha saído.
- F. Secar em placa aquecedora e montar com resina de montagem.

*Obs: O tempo de permanência no corante pode variar, devendo ser testado.

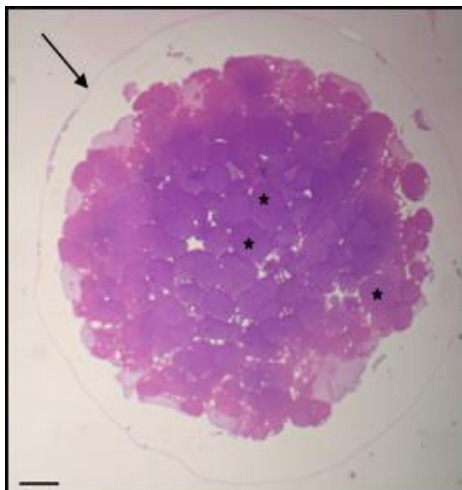


Figura 33. Embrião de *Loxosceles intermedia* com 3 dias, corado com Hematoxilina-Eosina. Símbolos: córion (seta) e os grânulos de vitelo (*). Escala: 100µm.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEIG, D.; BUENO, A.C. **Embriologia. Manual de laboratório.** 1987.

FOELIX, R.F. **Biology of Spiders.** 2ª Ed. New York Harvard. V. Press, Cambridge, 1996.

4. CONCLUSÕES

O estudo do desenvolvimento embrionário de *L. intermedia* sob o ponto de vista morfológico permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) Os ovos de *L. intermedia* são envoltos por duas camadas: externamente pelo córion, o qual é composto por grânulos de diversos tamanhos e de composição possivelmente protéica, e, mais internamente, por uma delgada membrana vitelínica.
- 2) O desenvolvimento embrionário de *L. intermedia* pode ser dividido em 10 diferentes estádios: zigoto, clivagem, formação da blástula, contração da blástula, formação do disco germinativo, gastrulação, segmentação, inversão, pré-larva e eclosão
- 3) Dois dos principais movimentos morfogenéticos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário são: a extensão convergente e a inversão.
- 4) Durante os estádios do desenvolvimento o vitelo sofre rearranjos, mudando a sua organização dentro do ovo.
- 5) Altas temperaturas não influenciam positivamente nas posturas durante os meses mais frios do ano, sugerindo a ocorrência de um ritmo biológico independente da temperatura.
- 6) Usando a parafina líquida, foi possível constatar que os ovos de *L. intermedia* mergulhados nesse meio continuam a se desenvolver normalmente até a eclosão, constituindo este uma técnica adequada à observação do seu desenvolvimento.
- 7) Para retirar o córion com mais facilidade a técnica utilizando o Carnoy como fixador teve um resultado mais satisfatório do que a técnica que utiliza o heptano e o metanol.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEa)



Nº 433

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEa internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

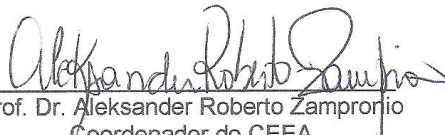
PROCESSO: 23075.108071/2009-28

APROVADO: 02/03/2010 – R.O. 01/2010

TÍTULO: Desenvolvimento embrionário da aranha marrom *Loxosceles intermedia*

AUTORES: Flávia Sant'Anna Rios, Mônica Akemi Okada, Cláudia Feijó O. Machado

DEPARTAMENTO: Biologia Celular


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEa